

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/EP05/002457

International filing date: 04 March 2005 (04.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: EP
Number: 04090089.6
Filing date: 05 March 2004 (05.03.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 13 April 2005 (13.04.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

Europäisches
PatentamtEuropean
Patent OfficeOffice européen
des brevets

11.02.05

Bescheinigung

Certificate

Attestation

Die angehefteten Unterlagen stimmen mit der ursprünglich eingereichten Fassung der auf dem nächsten Blatt bezeichneten europäischen Patentanmeldung überein.

The attached documents are exact copies of the European patent application described on the following page, as originally filed.

Les documents fixés à cette attestation sont conformes à la version initialement déposée de la demande de brevet européen spécifiée à la page suivante.

Patentanmeldung Nr. Patent application No. Demande de brevet n°

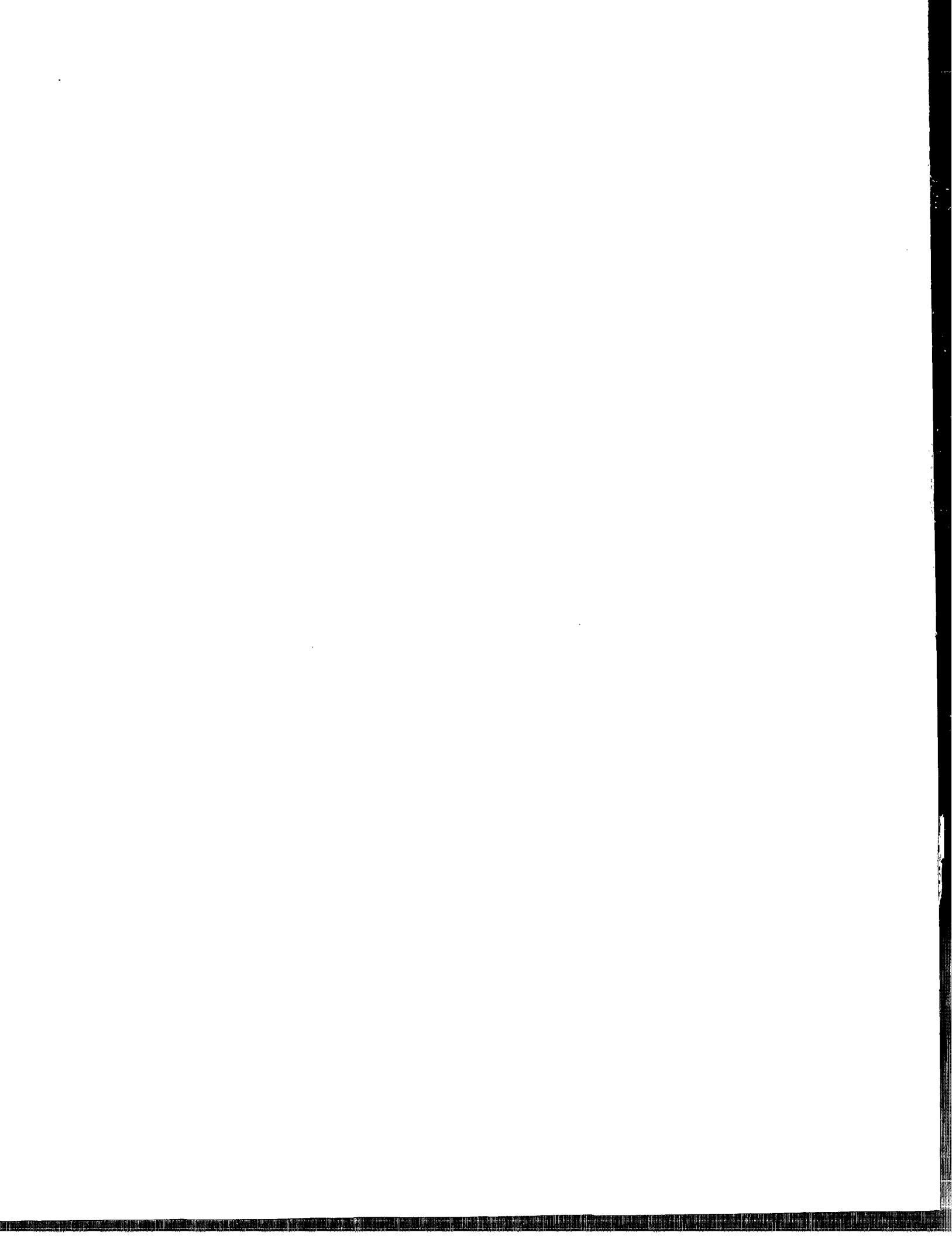
04090089.6

Der Präsident des Europäischen Patentamts;
Im Auftrag

For the President of the European Patent Office

Le Président de l'Office européen des brevets
p.o.

R C van Dijk





11.03.05

Anmeldung Nr:
Application no.: 04090089.6
Demande no:

Anmeldetag:
Date of filing: 05.03.04
Date de dépôt:

Anmelder/Applicant(s)/Demandeur(s):

Bayer CropScience GmbH
Brüningstrasse 50
65929 Frankfurt/Main
ALLEMAGNE

Bezeichnung der Erfindung/Title of the invention/Titre de l'invention:
(Falls die Bezeichnung der Erfindung nicht angegeben ist, siehe Beschreibung.
If no title is shown please refer to the description.
Si aucun titre n'est indiqué se referer à la description.)

Pflanzen mit erhöhter Aktivität mehrerer Stärke phosphorylierender Enzyme

In Anspruch genommene Priorität(en) / Priority(ies) claimed /Priorité(s) revendiquée(s)

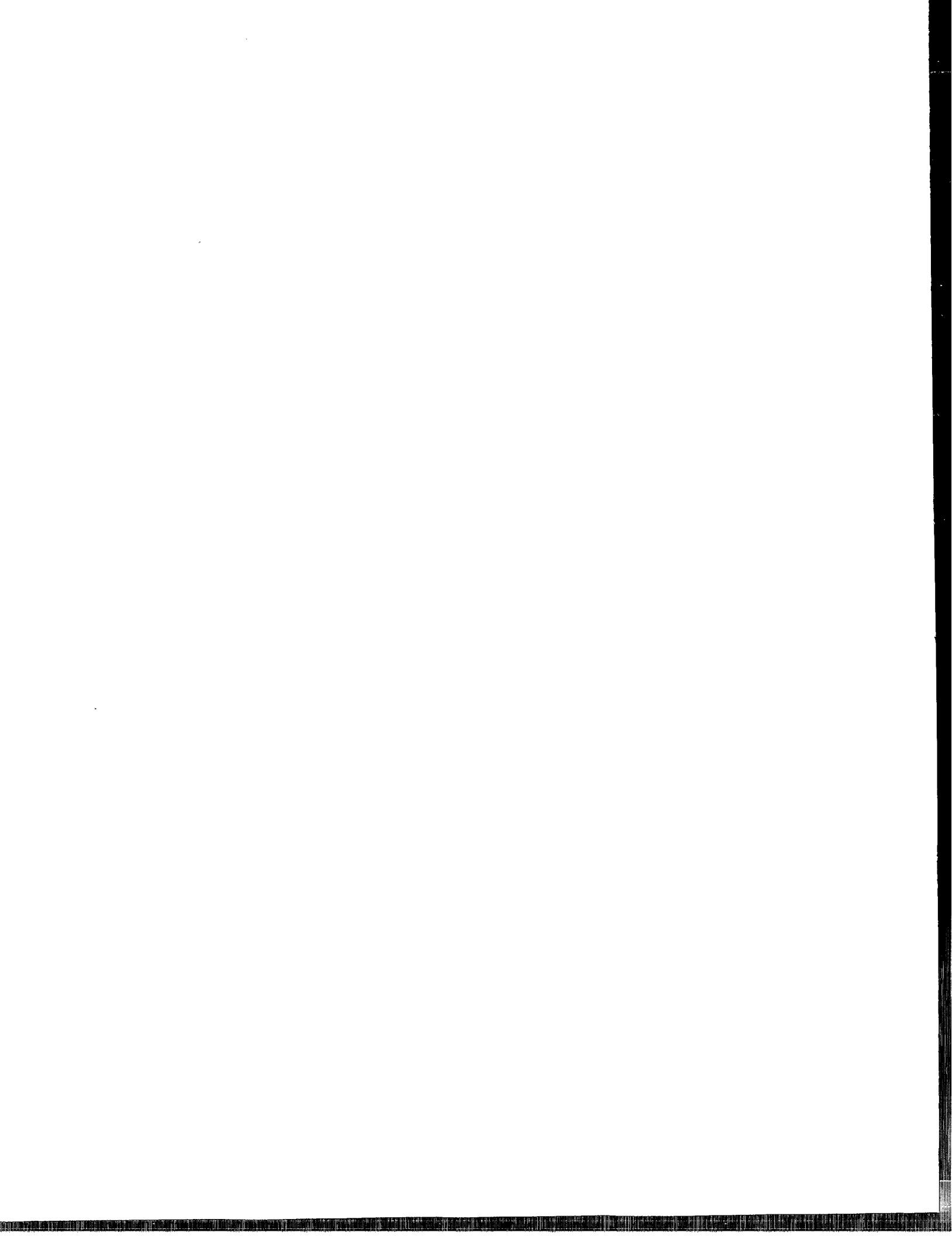
Staat/Tag/Aktenzeichen/State/Date/File no./Pays/Date/Numéro de dépôt:

Internationale Patentklassifikation/International Patent Classification/
Classification internationale des brevets:

A01H/

Am Anmeldetag benannte Vertragstaaten/Contracting states designated at date of filing/Etats contractants désignées lors du dépôt:

AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HU IE IT LU MC NL
PL PT RO SE SI SK TR LI



Pflanzen mit erhöhter Aktivität mehrerer Stärke phosphorylierender

5 Enzyme

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft Pflanzenzellen und Pflanzen, die genetisch modifiziert sind, wobei die genetische Modifikation zur Erhöhung der Aktivität eines Stärke phosphorylierenden OK1 Proteins und eines Stärke phosphorylierenden R1 Proteins im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen führt. Ferner betrifft die vorliegende Erfindung Mittel und Verfahren zur Herstellung solcher Pflanzenzellen und Pflanzen. Derartige Pflanzenzellen und Pflanzen synthetisieren eine modifizierte Stärke. Die vorliegende Erfindung betrifft daher auch die von den erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und Pflanzen synthetisierte Stärke, Verfahren zur Herstellung dieser Stärke, sowie die Herstellung von Stärkederivaten dieser modifizierten Stärke, als auch Mehle, enthaltend erfindungsgemäße Stärken.

Weiterhin betrifft die vorliegende Erfindung, Nucleinsäuremoleküle und Vektoren, enthaltend Sequenzen, die für ein OK1 Protein und ein R1 Protein codieren, sowie Wirtszellen, die diese Nucleinsäuremoleküle enthalten.

Im Hinblick auf die zunehmende Bedeutung, die pflanzlichen Inhaltsstoffen als erneuerbaren Rohstoffquellen zur Zeit beigemessen wird, ist es eine der Aufgaben der biotechnologischen Forschung, sich um eine Anpassung dieser pflanzlichen Rohstoffe an die Anforderungen der verarbeitenden Industrie zu bemühen. Um eine Anwendung von nachwachsenden Rohstoffen in möglichst vielen Einsatzgebieten zu ermöglichen, ist es darüber hinaus erforderlich, eine große Stoffvielfalt zu erreichen.

Das Polysaccharid Stärke ist aus chemisch einheitlichen Grundbausteinen, den Glucosemolekülen, aufgebaut, stellt jedoch ein komplexes Gemisch unterschiedlicher Molekülformen dar, die Unterschiede hinsichtlich des

Polymerisations- und des Verzweigungsgrades aufweisen und sich somit in ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften stark voneinander unterscheiden. Man differenziert zwischen Amylosestärke, einem im Wesentlichen unverzweigten Polymer aus alpha-1,4-glycosidisch verknüpften Glucoseeinheiten, und der

5 Amylopektinstärke, einem verzweigten Polymer, bei dem die Verzweigungen durch das Auftreten zusätzlicher alpha-1,6-glycosidischer Verknüpfungen zustande kommen. Ein weiterer wesentlicher Unterschied zwischen Amylose und Amylopektin liegt im Molekulargewicht. Während Amylose, je nach Herkunft der Stärke, ein Molekulargewicht von 5×10^5 – 10^6 Da besitzt, liegt das des Amylopektins zwischen 10 10^7 und 10^8 Da. Die beiden Makromoleküle können durch ihr Molekulargewicht und ihre unterschiedlichen physiko-chemischen Eigenschaften differenziert werden, was am einfachsten durch ihre unterschiedlichen Jodbindungseigenschaften sichtbar gemacht werden kann.

Amylose wurde lange als lineares Polymer, bestehend aus alpha-1,4-glycosidisch verknüpften alpha-D-Glucose-Monomeren, angesehen. In neueren Studien wurde jedoch die Anwesenheit von alpha-1,6-glycosidischen Verzweigungspunkten (ca. 0,1%) nachgewiesen (Hizukuri und Takagi, Carbohydr. Res. 134, (1984), 1-10; Takeda et al., Carbohydr. Res. 132, (1984), 83-92).

20 Die funktionellen Eigenschaften, wie z.B. die Löslichkeit, das Retrogradationsverhalten, das Wasserbindevermögen, die Filmbildungseigenschaften, die Viskosität, die Verkleisterungseigenschaften, die Gefrier-Tau-Stabilität, die Säurestabilität, die Gelfestigkeit, die Stärkekorngröße von Stärken werden u.a. durch das Amylose/Amylopektin-Verhältnis, das 25 Molekulargewicht, das Muster der Seitenkettenverteilung, den Gehalt an Ionen, den Lipid- und Proteingehalt, die mittlere Stärkekorngröße die Stärkekornmorphologie etc. beeinflusst. Die funktionellen Eigenschaften von Stärke werden auch vom Phosphatgehalt, einer nicht-Kohlenstoffkomponente von Stärke, beeinflusst. Dabei ist zwischen Phosphat, welches in Form von Monoestern kovalent an die 30 Glucosemoleküle der Stärke gebundenen ist (im Folgenden als Stärkephosphat bezeichnet) und Phosphat in Form von mit der Stärke assoziierten Phospholipiden zu unterscheiden.

Der Gehalt an Stärkephosphat variiert je nach Pflanzensorte. So synthetisieren z.B. bestimmte Maismutanten eine Stärke mit erhöhtem Gehalt an Stärkephosphat (waxy-Mais 0,002% und Hoch-Amylose-Mais 0,013%), während herkömmliche Mais Sorten 5 nur Spuren von Stärkephosphat aufweisen. Ebenfalls geringe Mengen an Stärkephosphat findet man in Weizen (0,001%) während in Hafer und Sorghum kein Stärkephosphat nachgewiesen werden konnte. In Reis-Mutanten wurde ebenfalls weniger Stärkephosphat gefunden (waxy-Reis 0,003%), als in herkömmlichen 10 Reissorten (0,013%). Signifikante Mengen von Stärkephosphat wurden in Knollen- oder Wurzelspeicherstärke synthetisierenden Pflanzen wie z.B. Tapioca (0,008%), Süßkartoffel (0,011%), Pfeilwurz (0,021%) oder Kartoffel (0,089%) nachgewiesen. Die im Vorangegangenen zitierten prozentualen Werte für den Stärkephosphatgehalt 15 beziehen sich jeweils auf das Trockengewicht der Stärke und sind von Jane et al. (1996, Cereal Foods World 41 (11), 827-832) ermittelt worden.

15 Stärkephosphat kann in Form von Monoestern an der C-2, C-3 oder C-6 Position der polymerisierten Glucosemonomere vorliegen (Takeda und Hizukuri, 1971, Starch/Stärke 23, 267-272). Die Phosphatverteilung des Phosphates in von Pflanzen synthetisierter Stärke zeichnet sich im Allgemeinen dadurch aus, dass etwa 30% bis 20 40% der Phosphatreste in C-3-Position und etwa 60% bis 70% der Phosphatreste in C-6-Position der Glucosemoleküle kovalent gebunden sind (Blennow et al., 2000, Int. J. of Biological Macromolecules 27, 211-218). Blennow et al. (2000, Carbohydrate Polymers 41, 163-174) ermittelten einen Gehalt an Stärkephosphat, der in C-6 Position der Glukosemoleküle gebunden ist; für verschiedene Stärken, wie z.B. 25 Kartoffelstärke (zwischen 7,8 und 33,5 nMol pro mg Stärke, je nach Sorte), Stärke aus verschiedenen *Curcuma* Spezies (zwischen 1,8 und 63 nMol pro mg), Tapiocastärke (2,5 nMol pro mg Stärke), Reisstärke (1,0 nMol pro mg Stärke), Mungbohnenstärke (3,5 nMol pro mg Stärke) und Sorghumstärke (0,9 nMol pro mg Stärke). In Gerstenstärke und Stärke aus verschiedenen waxy-Mutanten von Mais 30 konnten diese Autoren kein an der C-6-Position gebundenes Stärkephosphat nachweisen. Bisher konnte kein Zusammenhang zwischen dem Genotyp einer Pflanze und dem Gehalt von Stärkephosphat hergestellt werden (Jane et al., 1996,

Cereal Foods World 41 (11), 827-832). Daher ist es zurzeit nicht möglich, den Gehalt an Stärkephosphat in Pflanzen durch züchterische Maßnahmen zu beeinflussen.

Bisher ist nur ein Protein beschrieben, welches die Einführung von kovalenten

- 5 Bindungen von Phosphatresten an die Glucosemoleküle der Stärke vermittelt. Dieses Protein besitzt die enzymatische Aktivität einer alpha-Glucan-Wasser-Dikinase (GWD, E.C.: 2.7.9.4) (Ritte et al., 2002, PNAS 99, 7166-7171), wird in der wissenschaftlichen Literatur häufig als R1 bezeichnet und ist an die Stärkekörper der Speicherstärke in Kartoffelknollen gebunden (Lorberth et al., 1998, Nature 10 Biotechnology 16, 473-477). In der von R1 katalysierten Reaktion werden die Edukte alpha-1,4-Glucan (Stärke), Adenosintriphosphat (ATP) und Wasser zu den Produkten Glucan-Phosphat (Stärkephosphat), Monophosphat und Adenosinmonophosphat umgesetzt. Dabei wird der gamma-Phosphatrest des ATP auf Wasser und der beta-Phosphatrest des ATP auf das Glucan (Stärke) übertragen.
- 15 R1 überträgt *in vitro* den beta-Phosphatrest von ATP auf die C-6- und die C-3-Position der Glucosemoleküle von alpha-1,4-Glucanen. Das Verhältnis von C-6-Phosphat zu C-3 Phosphat, welches bei der *in vitro* Reaktion erhalten wird, entspricht dem Verhältnis, welches in Stärke, isoliert aus Pflanzen, vorliegt (Ritte et al., 2002, PNAS 99, 7166-7171). Da das Stärkephosphat in Kartoffelstärke zu etwa 20 70% in C-6-Position und zu etwa 30% in C-3-Position der Glucosemonomere der Stärke gebunden vorliegt, bedeutet dies, dass R1 bevorzugt die C-6-Position der Glucosemoleküle phosphoryliert. Weiterhin ist für R1 u.a. durch Verwendung von Amylopektin aus Mais gezeigt worden, dass es alpha-1,4-Glucane phosphorylieren kann, welche noch kein kovalent gebundenes Phosphat enthalten (Ritte et al., 2002, 25 PNAS 99, 7166-7171), d.h. R1 ist in der Lage, Phosphat *de novo* in alpha-1,4-Glucane einführen.

Weizenpflanzen, welche durch Überexpression eines R1 Gens aus Kartoffel eine erhöhte Aktivität eines R1 Proteins aufweisen, sind in WO 02 34923 beschrieben.

- 30 Diese Pflanzen synthetisieren im Vergleich zu entsprechenden Wildtyp-Pflanzen, in welchen kein Stärkephosphat detektiert werden konnte, eine Stärke mit signifikanten Mengen an Stärkephosphat in der C-6-Position der Glucosemoleküle.

Weitere Proteine, die eine Reaktion katalysieren, welche kovalent gebundene Phosphatgruppen in die Stärke einführen, sind bisher nicht beschrieben. Auch Enzyme, die bevorzugt Phosphatgruppen in C-3-Position und/oder C-2-Position der

5 Glucosemoleküle von Stärke einführen, sind nicht bekannt. Damit stehen abgesehen von der Erhöhung des Gehaltes an Stärkephosphat in Pflanzen auch keine Möglichkeiten zur Verfügung, die Phosphorylierung von Stärke in Pflanzen gezielt zu beeinflussen, die Phosphatverteilung innerhalb der von Pflanzen synthetisierten Stärke zu verändern und/oder den Gehalt an Stärkephosphat weiter zu erhöhen.

10

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zu Grunde, modifizierte Stärken mit erhöhtem Phosphatgehalt und/oder veränderter Phosphatverteilung sowie Pflanzenzellen und/oder Pflanzen, die eine solche modifizierte Stärke synthetisieren, als auch Verfahren und Mittel zur Erzeugung besagter Pflanzen und/oder 15 Pflanzenzellen zur Verfügung zu stellen.

Diese Aufgabe wird durch die in den Ansprüchen bezeichneten Ausführungsformen gelöst.

20 Somit betrifft die vorliegende Erfindung genetisch modifizierte Pflanzenzellen und Pflanzen, dadurch gekennzeichnet, dass sie eine erhöhte Aktivität mindestens eines OK1 Proteins und mindestens eines R1 Proteins im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen aufweisen.

25

Ein erster Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft eine Pflanzenzelle oder eine Pflanze, die genetisch modifiziert ist, wobei die genetische Modifikation zur Erhöhung der Aktivität mindestens eines OK1 Proteins und gleichzeitig mindestens eines R1 Proteins führt, im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-

30 Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen.

Die genetische Modifikation kann dabei jede genetische Modifikation sein, die zu einer Erhöhung der Aktivität mindestens eines OK1 Proteins und (gleichzeitig) mindestens eines R1 Proteins in genetisch modifizierten Pflanzenzellen oder genetisch modifizierten Pflanzen führt im Vergleich zu entsprechenden nicht

5 genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen oder Wildtyp-Pflanzen.

Der Begriff „Wildtyp-Pflanzenzelle“ bedeutet im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung, dass es sich um Pflanzenzellen handelt, die als Ausgangsmaterial für die Herstellung der erfindungsgemäßen Pflanzenzellen dienten, d.h. deren genetische

10 Information, abgesehen von der eingeführten genetischen Modifikation, der einer erfindungsgemäßen Pflanzenzelle entspricht.

Der Begriff „Wildtyp-Pflanze“ bedeutet im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung, dass es sich um Pflanzen handelt, die als Ausgangsmaterial für die

15 Herstellung der erfindungsgemäßen Pflanzen dienten, d.h. deren genetische Information, abgesehen von der eingeführten genetischen Modifikation, der einer erfindungsgemäßen Pflanze entspricht.

Der Begriff „entsprechend“ bedeutet im Zusammenhang mit der vorliegenden

20 Erfindung, dass beim Vergleich von mehreren Gegenständen die betreffenden Gegenstände, die miteinander verglichen werden, unter gleichen Bedingungen gehalten wurden. Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung bedeutet der Begriff „entsprechend“ im Zusammenhang mit Wildtyp-Pflanzenzelle oder Wildtyp-Pflanze, dass die Pflanzenzellen oder Pflanzen, die miteinander verglichen werden, 25 unter gleichen Kulturbedingungen aufgezogen wurden und dass sie ein gleiches (Kultur-) Alter aufweisen.

Der Begriff "erhöhte Aktivität mindestens eines OK1 Proteins" bedeutet dabei im

30 Rahmen der vorliegenden Erfindung eine Erhöhung der Expression endogener Gene, die OK1 Proteine codieren und/oder eine Erhöhung der Menge an OK1 Protein in den Zellen und/oder eine Erhöhung der enzymatischen Aktivität von OK1 Proteinen in den Zellen.

Der Begriff "erhöhte Aktivität mindestens eines R1 Proteins" bedeutet dabei im Rahmen der vorliegenden Erfindung eine Erhöhung der Expression endogener Gene, die R1 Proteine codieren und/oder eine Erhöhung der Menge an R1 Protein in 5 den Zellen und/oder eine Erhöhung der enzymatischen Aktivität von R1 Proteinen in den Zellen.

Die Erhöhung der Expression kann beispielsweise bestimmt werden durch Messung der Menge an Transkripten, die OK1 Proteine oder R1 Proteine codieren. Dieses 10 kann z.B. durch Northern-Blot-Analyse oder RT-PCR erfolgen. Eine Erhöhung bedeutet dabei vorzugsweise eine Erhöhung der Menge an Transkripten im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Zellen um mindestens 50%, insbesondere um mindestens 70%, bevorzugt um mindestens 85% und besonders bevorzugt um mindestens 100%. Eine Erhöhung der Menge an 15 Transkripten, codierend ein OK1 Protein, bedeutet auch, dass Pflanzen oder Pflanzenzellen, die keine nachweisbaren Mengen an Transkripten, codierend ein OK1 Protein aufweisen, nach erfindungsgemäßer genetischer Modifikation nachweisbare Mengen an Transkripten, codierend ein OK1 Protein aufweisen. Eine Erhöhung der Menge an Transkripten, codierend ein R1 Protein, bedeutet auch, dass 20 Pflanzen oder Pflanzenzellen, die keine nachweisbaren Mengen an Transkripten, codierend ein R1 Protein, aufweisen, nach erfindungsgemäßer genetischer Modifikation nachweisbare Mengen an Transkripten, codierend ein R1 Protein, aufweisen.

25 Die Erhöhung der Menge an Protein eines OK1 Proteins oder eines R1 Proteins, die eine erhöhte Aktivität dieser Proteine in den betreffenden Pflanzenzellen zur Folge hat, kann beispielsweise bestimmt werden durch immunologische Methoden wie Western-Blot-Analyse, ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) oder RIA (Radio Immune Assay). Eine Erhöhung bedeutet dabei vorzugsweise eine Erhöhung 30 der Menge Protein im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Zellen um mindestens 50%, insbesondere um mindestens 70%, bevorzugt um mindestens 85% und besonders bevorzugt um mindestens 100%. Eine Erhöhung der

Menge an OK1 Protein bedeutet auch, dass Pflanzen oder Pflanzenzellen, die keine nachweisbare Aktivität eines OK1 Proteins aufweisen, nach erfindungsgemäßer genetischer Modifikation eine nachweisbare Menge eines OK1 Proteins aufweisen. Eine Erhöhung der Menge an R1 Protein bedeutet auch, dass Pflanzen oder

5 Pflanzenzellen, die keine nachweisbare Aktivität eines R1 Proteins aufweisen, nach erfindungsgemäßer genetischer Modifikation eine nachweisbare Menge eines R1 Proteins aufweisen.

Methoden zur Herstellung von Antikörpern, die spezifisch mit einem bestimmten
10 Protein reagieren, d.h. die spezifisch an besagtes Protein binden, sind dem Fachmann bekannt (siehe z.B. Lottspeich und Zorbas (Eds.), 1998, Bioanalytik, Spektrum akad, Verlag, Heidelberg, Berlin, ISBN 3-8274-0041-4). Die Herstellung solcher Antikörper wird von einigen Firmen (z.B. Eurogentec, Belgien) als Auftragsservice angeboten. Eine Möglichkeit zur Herstellung von Antikörpern, die mit
15 einem OK1 Protein spezifisch reagieren, ist weiter unten beschrieben (siehe Beispiel 10). Ein Antikörper, mit welchem eine Erhöhung der Menge an R1 Protein mittels immunologischer Methoden festgestellt werden kann, ist bei Lorberth et al. (1998, Nature Biotechnology 16, 473-477) und Ritte et al. (2000, Plant Journal 21, 387-391) beschrieben.

20

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung soll unter dem Begriff „OK 1 Protein“ ein Protein verstanden werden, welches einen Phosphatrest von ATP auf bereits phosphorylierte Stärke (P-Stärke) überträgt. Stärken, isoliert aus Blättern einer *Arabisopsis thaliana* sex1-3 Mutante weisen keine nachweisbaren Mengen an
25 kovalent gebundenen Phosphatresten auf und werden von einem OK1 Protein nicht phosphoryliert, d.h. ein erfindungsgemäßes OK1 Protein benötigt bereits phosphorylierte Stärke als Substrat zur Übertragung weiterer Phosphatreste.

Bevorzugt wird von einem OK1 Protein der beta-Phosphatrest des ATP auf die Stärke und der gamma-Phosphatrest des ATP auf Wasser übertragen. Als weiteres
30 Reaktionsprodukt entsteht bei einer durch ein OK1 Protein durchgeführten Phosphorylierungsreaktion von P-Stärke AMP (Adenosinmonophosphat). Ein Ok1

Protein wird daher als [phosphoryliertes-alpha-Glucan]-Wasser-Dikinase ([P-Glucan]-Wasser-Dikinase) bzw. als [phosphorylierte-Stärke]-Wasser-Dikinase bezeichnet.

Bevorzugt entsteht an der durch ein OK1 Protein phosphorylierten P-Stärke eine zusätzliche Phosphatmonoesterbindung in C-6-Position und/oder in C-3-Position

5 eines Glucosemoleküls der P-Stärke. Besonders bevorzugt entstehen bei der durch ein OK1 Protein katalysierten Phosphorylierung von P-Stärke mehr zusätzliche Phosphatmonoesterbindungen in C-3-Position im Vergleich zu Phosphatmonoesterbindungen in C-6-Position der Glucosemoleküle der betreffenden P-Stärke.

10 Aminosäuresequenzen, die OK1 Proteine codieren, enthalten eine Phosphohistidindomäne. Phosphohistidindomänen sind z.B. beschrieben bei Tien-Shin Yu et al. (2001, Plant Cell 13, 1907-1918). Bevorzugt enthalten Phosphohistidindomänen von OK1 Proteine codierenden Aminosäuresequenzen zwei Histidine.

15 Bei der Katalyse einer Phosphorylierungsreaktion einer P-Stärke durch ein OK1 Protein entsteht als Zwischenprodukt ein phosphoryliertes OK1 Protein, bei welchem ein Phosphatrest des ATP kovalent an eine Aminosäure des OK1 Proteins gebunden ist. Das Zwischenprodukt entsteht durch Autophosphorylierung des OK1 Proteins, d.h. das OK1 Protein selbst katalysiert die Reaktion, die zu dem Zwischenprodukt

20 führt. Bevorzugt wird durch die Autophosphorylierung ein Histidinrest der Aminosäuresequenz, codierend ein OK1 Protein, phosphoryliert, besonders bevorzugt ein Histidinrest, der Bestandteil einer Phosphohistidindomäne ist.

Weiterhin weisen erfindungsgemäße OK1 Proteine eine erhöhte Bindungsaktivität zu P-Stärke auf im Vergleich zu nicht-phosphorylierter-Stärke.

25 Da bisher keine Enzyme beschrieben sind, die P-Stärke als Substrat benötigen, um diese weiter zu phosphorylieren, war es bisher auch nicht möglich, den Gehalt an Stärkephosphat von bereits phosphorylierter-Stärke in Pflanzen über ein gewisses Maß hinaus zu steigern. Dieses ist nun durch Verwendung eines erfindungsgemäßen Proteins oder eines erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküls zur genetischen Modifikation von Pflanzen möglich. Die Aufklärung der Funktion eines OK1 Proteins und damit die Bereitstellung eines OK1 Proteins führt dazu, dass nun Pflanzen

dahingehend genetisch modifiziert werden können, dass sie eine Stärke mit veränderten Eigenschaften synthetisieren. Das Verändern der Phosphatverteilung in von Pflanzen synthetisierter Stärke war aus Mangel an zur Verfügung stehenden Mitteln bisher nicht möglich. Durch die Bereitstellung erfundungsgemäßer Proteine 5 und Nucleinsäuren durch die vorliegende Erfindung ist nun auch eine Veränderung des Phosphatverhältnisses in nativen Stärken möglich.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung soll unter dem Begriff „R1 Protein“ ein 10 Protein verstanden werden, welches einen Phosphatrest von ATP auf Stärke überträgt. Stärken, isoliert aus Blättern einer *Arabidopsis thaliana* sex1-3 Mutante weisen keine nachweisbaren Mengen an kovalent gebundenen Phosphatresten auf werden jedoch von einem R1 Protein phosphoryliert. D.h. nicht-phosphorylierte- 15 Stärke, z.B. isoliert aus Blättern einer *Arabidopsis thaliana* sex1-3 Mutante wird in einer durch ein R1 Protein katalysierten Phosphorylierungsreaktion als Substrat verwendet.

Bevorzugt wird von einem R1 Protein der beta-Phosphatrest des ATP auf die Stärke und der gamma-Phosphatrest des ATP auf Wasser übertragen. Als weiteres Reaktionsprodukt entsteht AMP (Adenosinmonophosphat). Ein R1 Protein wird daher 20 als [alpha-1,4-Glucan]-Wasser-Dikinase bzw. als Stärke- Wasser-Dikinase bezeichnetnet (E.C.: 2.7.9.4; Ritte et al., 2002, PNAS 99, 7166-7171).

Bei der durch ein R1 Protein katalysierten Phosphorylierung von Stärke entstehen mehr zusätzliche Phosphatmonoesterbindungen in C-6-Position im Vergleich zu Phosphatmonoesterbindungen in C-3-Position der Glucosemoleküle der betreffenden 25 Stärke. Von einem R1 Protein werden ca. 60% bis 70% der Phosphatreste in C-6-Position und ca. 30% bis 40% der Phosphatreste in C-3-Position der Glucosemoleküle von Stärke eingeführt (Ritte et al., 2002, PNAS 99, 7166-7171).

Bei der Katalyse einer Phosphorylierungsreaktion einer Stärke durch ein R1 Protein entsteht als Zwischenprodukt ein phosphoryliertes R1 Protein, bei welchem ein 30 Phosphatrest des ATP kovalent an eine Aminosäure das R1 Proteins gebunden ist (Ritte et al., 2002, PNAS 99, 7166-7171). Das Zwischenprodukt entsteht durch Autophosphorylierung des R1 Proteins, d.h. das R1 Protein selbst katalysiert die

Reaktion, die zu dem Zwischenprodukt führt. Aminosäuresequenzen, die OK1 Proteine codieren, enthalten eine Phosphohistidindomäne. Phosphohistidindomänen sind z.B. beschrieben bei Tien-Shin Yu et al. (2001, Plant Cell 13, 1907-1918). Bevorzugt enthalten Phosphohistidindomänen von R1 Proteine codierenden

5 Amionosäuresequenzen ein Histidin. Durch die Autophosphorylierung eines R1 Proteins wird ein Histidinrest in einer Phosphohistidindomäne der Aminosäuresequenz, codierend ein R1 Protein, phosphoryliert (Mikkelsen et al., 2003, Biochemical Journal Intermediate Publication. Published on October 2003 as manuscript BJ20030999).

10 Nukleinsäuresequenzen und zu diesen korrespondierende Aminosäuresequenzen, codierend ein R1 Protein sind aus unterschiedlichen Spezies, wie z.B. Kartoffel (WO 97 11188, GenBank Acc.: AY027522, Y09533), Weizen (WO 00 77229, US 6,462,256, GenBank Acc.: AAN93923, GenBank Acc.: AR236165), Reis (GenBank Acc.: AAR61445, GenBank Acc.: AR400814), Mais (GenBank Acc.: AAR61444, 15 GenBank Acc.: AR400813), Soyabohne (GenBank Acc.: AAR61446, GenBank Acc.: AR400815), Citrus (GenBank Acc.: AY094062) und *Arabidopsis* (GenBank Acc.: AF312027) beschrieben. Die genannten Nucleinsäuresequenzen und Aminosäuresequenzen codierend R1 Proteine sind u.a. veröffentlicht vom NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/>) und sind durch Nennung der Referenzen 20 ausdrücklich in die Beschreibung der vorliegenden Anmeldung aufgenommen.

Unter dem Begriff „erhöhte Bindungsaktivität“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung, eine erhöhte Affinität eines Proteins zu einem ersten Substrat im Vergleich zu einem zweiten Substart verstanden werden. D.h., dass die 25 Menge an Protein, die unter gleichen Inkubationsbedingungen vermehrt an ein erstes Substrat im Vergleich zu einem zweiten Substrat bindet, eine erhöhte Bindungsaktivität zu dem ersten Substrat aufweist.

Unter dem Begriff „Stärkephosphat“ sollen im Zusammenhang mit der vorliegenden 30 Erfindung kovalent an die Glucosemoleküle von Stärke gebundene Phosphatgruppen verstanden werden.

Unter dem Begriff „nicht-phosphorylierte-Stärke“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung eine Stärke verstanden werden, welche keine nachweisbaren Mengen an Stärkephosphat enthält. Zur Bestimmung der Menge an Stärkephosphat sind verschiedene Methoden beschrieben. Bevorzugt kann die bei Ritte et al. (2000, 5 Starch/Stärke 52, 179-185) beschriebene Methode zur Bestimmung der Menge von Stärkephosphat verwendet werden. Besonders bevorzugt wird die Bestimmung der Menge an Stärkephosphat mittels ^{31}P -NMR nach der bei Kasemusuwan und Jane (1996, Cereal Chemistry 73, 702-707) beschriebenen Methode durchgeführt.

10 Unter dem Begriff „phosphorylierte-Stärke“ oder „P-Stärke“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung eine Stärke verstanden werden, welche Stärkephosphat enthält.

Nachgewiesen werden kann die Aktivität eines OK1 Proteins z.B. durch *in vitro* 15 Inkubation eines OK1 Proteins unter Verwendung von ATP, welches einen in der beta-Position markierten Phosphatrest enthält (markiertes ATP). Zu bevorzugen ist ATP, bei welchem der Phosphatrest in beta-Position spezifisch markiert ist, d.h. bei welchem nur der Phosphatrest in beta-Position eine Markierung trägt. Bevorzugt wird radioaktiv markiertes ATP, besonders bevorzugt ATP, bei welchem der Phosphatrest 20 in beta-Position spezifisch radioaktiv markiert ist und insbesondere bevorzugt wird ATP, bei welchem der Phosphatrest in beta-Position spezifisch mit ^{33}P markiert ist, verwendet. Wird ein OK1 Protein mit markiertem ATP und Stärken, welche nicht phosphoryliert sind, inkubiert, wird kein Phosphat durch OK1 auf die Stärke übertragen. Bevorzugt wird Blattstärke der *Arabidopsis thaliana* Mutante *sex1-3* 25 (Tien-Shin Yu et al., 2001, Plant Cell 13, 1907-1918) verwendet.

Wird ein OK1 Protein hingegen mit P-Stärke in Gegenwart von markiertem ATP 30 inkubiert, so kann anschließend kovalent an die P-Stärke gebundenes markiertes Phosphat nachgewiesen werden. Bevorzugt wird Stärke aus Blättern von *Arabidopsis thaliana*, besonders bevorzugt mittels eines R1 Proteins enzymatisch phosphorylierte Stärke aus *Arabidopsis thaliana sex1-3* Mutanten (Ritte et al., 2002, PNAS 99, 7166-7171) verwendet.

Nachgewiesen werden können markierte Phosphatreste, die durch ein OK1 Protein in P-Stärke eingebaut wurden z.B. durch Abtrennung der markierten P-Stärke (z.B. durch Ausfällen mittels Ethanol, Filtration, chromatographische Methoden etc.) vom Rest des Reaktionsgemisches und anschließender Detektion der markierten Phosphatreste in der P-Stärke Fraktion. Die in der P-Stärke Fraktion gebundenen markierten Phosphatreste können dabei z.B. durch Bestimmung der Menge der in der P-Stärke Fraktion vorliegenden Radioaktivität (z.B. mittels Szintillationszähler) nachgewiesen werden. Mögliche Methoden zum Nachweis eines Proteins, welches P-Stärke als Substrat für eine Phosphorylierungsreaktion benötigt, ist weiter unten unter Allgemeine Methoden, Punkt 11 und in Beispiel 6 beschrieben.

Die Aktivität eines R1 Proteins kann z.B. nachgewiesen werden wie in der Literatur beschrieben (Mikkelsen et al., 2003, Biochemical Journal Intermediate Publication. Published on October 2003 as manuscript BJ20030999; Ritte et al., 2002, PNAS 99, 7166-7171).

Welche Positionen der Kohlestoffatome (C-2, C-3 oder C-6) der Glucosemonomere in P-Stärke von einem OK1 Protein bevorzugt phosphoryliert werden, kann z.B. durch Analyse der durch ein Protein phosphorylierten P-Stärken wie bei Ritte et al. (2002, PNAS 99, 7166-7171) beschrieben, ermittelt werden. Hierzu wird durch ein Protein phosphorylierte P-Stärke unter Verwendung von Säure hydrolysiert und anschließend mittels Anionenaustausch-Chromatographie analysiert.

Bevorzugt wird die von einem OK1 Protein phosphorylierte P-Stärke mittels NMR analysiert, um festzustellen, welche Positionen der Kohlestoffatome (C-2, C-3 oder C-6) der Glucosemonomere in der P-Stärke phosphoryliert werden. Eine besonders bevorzugte Methode zur Identifizierung der C-Atom-Positionen eines Glucosemoleküls einer Stärke, welche durch eine von einem OK1 Protein katalysierte Reaktion phosphoryliert werden, ist weiter unten unter Allgemeine Methoden, Punkt 13 beschrieben.

30

Welche Positionen der Kohlestoffatome (C-2, C-3 oder C-6) der Glucosemonomere in Stärke von einem R1 Protein bevorzugt phosphoryliert werden, kann z.B. durch

Analyse der durch ein R1 Protein phosphorylierten Stärken wie bei Ritte et al. (2002, PNAS 99, 7166-7171) beschrieben, ermittelt werden. Hierzu wird durch ein Protein phosphorylierte Stärke unter Verwendung von Säure hydrolysiert und anschließend mittels Anionenaustausch-Chromatographie analysiert.

5

Bevorzugt wird die von einem OK1 Protein phosphorylierte P-Stärke oder die von einem R1 Protein phosphorylierte Stärke mittels NMR analysiert, um festzustellen, welche Positionen der Kohlestoffatome (C-2, C-3 oder C-6) der Glucosemonomere in der P-Stärke bzw. der Stärke phosphoryliert werden. Eine besonders bevorzugte

10 Methode zur Identifizierung der C-Atom-Positionen eines Glucosemoleküls einer Stärke, welche durch eine von einem OK1 Protein oder R1 Protein katalysierte Reaktion phosphoryliert werden, ist weiter unten unter Allgemeine Methoden, Punkt 13 beschrieben.

15 Ein phosphoryliertes Protein, welches als Zwischenprodukt bei der durch ein OK1 Protein vermittelten Phosphorylierung von P-Stärke entsteht, kann wie z.B. bei Ritte et al. (2002, PNAS 99, 7166-7171) oder Mikkelsen et al. (2003, Biochemical Journal Intermediate Publication. Published on October 2003 as manuscript BJ20030999) für ein R1 Protein beschrieben, nachgewiesen werden

20

Zum Nachweis des Vorliegens eines autophosphorylierten Zwischenproduktes wird ein OK1 Protein zunächst in Abwesenheit von Stärke mit markiertem ATP, bevorzugt mit spezifisch in beta-Phosphat-Position markiertem ATP, besonders bevorzugt mit spezifisch mit ^{33}P in beta-Phosphat-Position markiertem ATP inkubiert. Parallel dazu

25 wird ein Reaktionsansatz 2, der jedoch an Stelle von markiertem ATP entsprechende Mengen nicht-markiertes ATP enthält, unter ansonsten gleichen Bedingungen inkubiert. Anschließend wird nicht markiertes ATP dem Reaktionsgemisch 1 im Überschuß und eine Mischung aus nicht-markiertem ATP und markiertem ATP (gleiche Menge von markiertem ATP wie zuvor in Reaktionsgemisch 1 eingesetzt 30 und gleiche Menge an nicht-markiertem ATP wie dem Reaktionsgemisch 1 im Überschuß zugesetzt) dem Reaktionsgemisch 2 hinzu gegeben und weiter inkubiert, bevor zu einem Teil A des Reaktionsgemisches 1 (Teil 1A) bzw. zu einem Teil A des

Reaktionsgemisches 2 (Teil 2A) P-Stärke hinzu gegeben werden. Die Reaktion im verbleibenden Teil 1B und Teil 2B des Reaktionsgemisches wird durch Denaturieren des Proteins gestoppt. Das Stoppen des Teils B der Reaktionsgemische kann durch dem Fachmann bekannte Methoden, welche zur Denaturierung von Proteinen 5 führen, bevorzugt durch Zugabe von Natriumlaurylsulfat (SDS) erfolgen. Teil 1A und Teil 2A der Reaktionsgemische werden für mindestens weitere 10 Minuten inkubiert, bevor auch diese Reaktionen gestoppt werden. Die in Teil A bzw. Teil B der jeweiligen Reaktionsgemische vorliegende Stärke wird vom jeweiligen Rest der Reaktionsgemische abgetrennt. Findet die Abtrennung der jeweiligen Stärke z.B. 10 durch Zentrifugation statt, so befindet sich die Stärke des jeweiligen Teils A bzw. jeweiligen Teils B der Reaktionsgemische nach erfolgter Zentrifugation im sedimentierten Pellet und die sich in den jeweiligen Reaktionsgemischen befindlichen Proteine befinden sich im jeweiligen Zentrifugationsüberstand. Der Überstand des Teils 1A bzw. 2A und des Teils 1B bzw. 2B der Reaktionsgemische 15 kann anschließend z.B. jeweils in einer denaturierenden Acrylamidgelelektrophorese, gefolgt von einer Autoradiographie des erhaltenen Acrylamidgels analysiert werden. Zur Quantifizierung der Menge an radioaktiv markierten Proteinen, die mittels Acrylamidgelelektrophorese aufgetrennt wurden, kann z.B. die dem Fachmann bekannte Methode des so genannten „Phosphoimagings“ verwendet werden. Zeigt 20 die Autoradiographie oder die Analyse mittels „Phosphoimager“ von Proteinen im Zentrifugationsüberstand des Teil B des Reaktionsgemisches 1 ein gegenüber dem Zentrifugationsüberstand des Teil A des Reaktionsgemisches 1 ein signifikant erhöhtes Signal, so zeigt dieses, dass das eine Phosphorylierung von Stärke vermittelnde Protein als autophosphoryliertes Zwischenprodukt auftritt. Die Teile A 25 und B des Reaktionsgemisches 2 dienen als Kontrolle und sollten daher im Zentrifugationsüberstand kein signifikant erhöhtes Signal in der Autoradiographie oder in der Analyse mittels „Phosphoimager“ aufweisen.

Zusätzlich kann die im jeweiligen sedimentierten Pellet verbliebene Stärke des jeweiligen Teils A der Reaktionsgemische 1 und 2, gegebenenfalls nach 30 anschließendem Waschen der jeweiligen Stärken, auf das Vorliegen von Stärkephosphat, welches eine dem eingesetzten markierten ATP entsprechende Markierung aufweist, hin untersucht werden. Enthalten die Stärken des Teils A des

Reaktionsgemisches 1 markierte Phosphatreste und zeigt, die Autoradiographie des Zentrifugationsüberstandes des Teil B des Reaktionsgemisches 1 ein gegenüber dem Zentrifugationsüberstand des Teil A des Reaktionsgemisches 1 ein signifikant erhöhtes Signal in der Autoradiographie, so zeigt dieses, dass das eine

5 Phosphorylierung von Stärke vermittelnde Protein als autophosphoryliertes Zwischenprodukt vorliegt. Die Teile A und B des Reaktionsgemisches 2 dienen als Kontrolle und sollten daher im sedimentierten Pellet, enthaltend alpha-1,4-Glucane, kein signifikant erhöhtes Signal für mit ^{33}P markierte alpha-1,4-Glucane aufweisen. Möglichkeiten zum Nachweis eines phosphorylierten OK1 Protein
10 Zwischenproduktes sind weiter unten unter Allgemeine Methoden Punkt 12 und in Beispiel 7 beschrieben.

Dass ein OK1 Protein eine erhöhte Bindungsaktivität zu einer P-Stärke im Vergleich zu nicht-phosphorylierter-Stärke aufweist, kann durch Inkubation des OK1 Proteins
15 mit P-Stärke und nicht-phosphorylierter-Stärke in jeweils getrennten Ansätzen erfolgen.

Zur Inkubation von OK1 Proteinen mit nicht-phosphorylierter-Stärke sind grundsätzlich alle nicht-phosphorylierten-Stärken geeignet. Bevorzugt wird eine nicht-phosphorylierte pflanzliche Stärke, besonders bevorzugt Weizenstärke und
20 insbesondere bevorzugt granuläre Blattstärke einer *Arabidopsis thaliana* Mutante *sex1-3* verwendet.

Methoden z.B. zur Isolierung von Stärke aus Pflanzen sind dem Fachmann bekannt. Alle dem Fachmann bekannten Methoden sind grundsätzlich geeignet, um nicht-phosphorylierte-Stärke aus entsprechenden Pflanzenspezies zu isolieren. Bevorzugt
25 wird die weiter unten (siehe Allgemeine Methoden Punkt 2) beschriebene Methode zur Isolierung von nicht-phosphorylierter-Stärke verwendet.

Zur Inkubation von OK1 Proteinen mit P-Stärke sind grundsätzlich alle Stärken geeignet, die Stärkephosphat enthalten. Auch chemisch phosphorylierte Stärken
30 können hierbei verwendet werden. Vorzugsweise werden zur Inkubation mit OK1 Proteinen P-Stärken eingesetzt, besonders bevorzugt eine nachträglich enzymatisch phosphorylierte pflanzliche Stärke, insbesondere bevorzugt eine nachträglich

enzymatisch phosphorylierte pflanzliche granuläre Stärke, die aus einer sex-1 Mutante von *Arabidopsis thaliana* isoliert wurde.

Zum Nachweis einer erhöhten Bindungsaktivität von OK1 Proteinen zu P-Stärke im
5 Vergleich zu nicht-phosphorylierter-Stärke werden OK1 Proteine in voneinander
getrennten Ansätzen mit P-Stärke (Ansatz A) und mit nicht-phosphorylierter-Stärke
(Ansatz (B) inkubiert. Nach erfolgter Inkubation werden die nicht an die betreffenden
Stärken der Ansätze A und B gebundenen Proteine von den Stärken und den an sie
gebundenen Proteinen abgetrennt. Die Bindung zwischen den Proteinen und der P-
10 Stärke im Ansatz A und die Bindung zwischen den Proteinen und nicht-
phosphorylierter-Stärke im Ansatz B wird anschließend aufgehoben, d.h. die
betreffenden Proteine werden in Lösung gebracht. Die in Lösung gebrachten
Proteine des Ansatzes A und des Ansatzes B können dann von den betreffenden
Stärken, die in den entsprechenden Ansätzen vorliegen, abgetrennt werden.
15 Daraufhin kann eine Auftrennung der isolierten P-Stärke-bindenden-Proteine des
Ansatzes A bzw. der isolierten nicht-phosphorylierte-Stärke-bindenden-Proteine des
Ansatzes B, mit Hilfe von dem Fachmann bekannten Methoden, wie z.B. Gelfiltration,
chromatographische Verfahren, Elektrophorese, SDS-Acrylamidgelektrophorese
etc. erfolgen. Durch Vergleich der Mengen aufgetrennter Proteine des Ansatzes A
20 mit den Mengen korrespondierender aufgetrennter Proteine des Ansatzes B, kann
ermittelt werden, ob ein Protein eine erhöhte Bindungsaktivität gegenüber P-Stärke
im Vergleich zu nicht-phosphorylierten-Stärke aufweisen. Methoden, mit welchen
eine bevorzugte Bindung von Proteinen an P-Stärke im Vergleich zu nicht-
phosphorylierter-Stärke nachgewiesen werden kann, sind weiter unten in Beispiel 8
25 beschrieben.

Die in SEQ ID NO 2 dargestellte Aminosäuresequenz codiert ein OK1 Protein aus
Arabidopsis thaliana und die unter SEQ ID NO 4 dargestellte Aminosäuresequenz
codiert ein OK 1 Protein aus *Oryza sativa*.

30

In einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung weisen
Aminosäuresequenzen codierend ein OK1 Proteine eine Identität mit der in SEQ ID

NO 2 oder SEQ ID NO 4 angegebenen Sequenz eine Identität von mindestens 60%, insbesondere von mindestens 70%, bevorzugt von mindestens 80% und besonders bevorzugt von mindestens 90% und insbesondere bevorzugt von mindestens 95% auf.

5

In einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung weist das OK1 Protein eine Phosphohistidindomäne auf. Aminosäuresequenzen, codierend OK1 Proteine, enthalten eine Phosphohistidindomäne, die zu der unter SEQ ID NO 5 dargestellten Aminosäuresequenz der Phosphohistidindomäne des OK1 Proteins aus *Arabidopsis thaliana* eine Identität von mindestens 60%, insbesondere von mindestens 70%, bevorzugt von mindestens 80% und besonders bevorzugt von mindestens 90% und insbesondere bevorzugt von mindestens 95% aufweist.

Eine weitere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft eine erfindungsgemäße genetisch modifizierte Pflanzenzelle oder eine erfindungsgemäße genetisch modifizierte Pflanze, wobei die genetische Modifikation in der Einführung mindestens eines fremden Nucleinsäuremoleküls in das Genom der Pflanze besteht.

In diesem Zusammenhang bedeutet der Begriff „genetische Modifikation“ das Einführen von homologen und/oder heterologen fremden Nucleinsäuremolekülen in das Genom einer Pflanzenzelle oder in das Genom einer Pflanze, wobei besagtes Einführen dieser Moleküle zur Erhöhung der Aktivität eines OK1 Proteins und zur Erhöhung der Aktivität eines R1 Proteins führt.

Durch Einführung eines fremden Nucleinsäuremoleküls sind die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen oder erfindungsgemäßen Pflanzen in ihrer genetischen Information verändert. Das Vorhandensein oder die Expression eines fremden Nucleinsäuremoleküls führt zu einer phänotypischen Veränderung. „Phänotypische“ Veränderung bedeutet dabei vorzugsweise eine messbare Veränderung einer oder mehrerer Funktionen der Zellen. Beispielsweise zeigen die genetisch modifizierten erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und die genetisch modifizierten erfindungsgemäßen Pflanzen aufgrund des Vorhandenseins oder bei Expression

eingeführter Nucleinsäuremoleküle eine Erhöhung der Aktivität eines OK1 Proteins und eine Erhöhung der Aktivität eines R1 Proteins.

Unter dem Begriff "fremdes Nukleinsäuremolekül" versteht man im Zusammenhang 5 mit der vorliegenden Erfindung ein solches Molekül, das entweder natürlicherweise in entsprechenden Wildtyp-Pflanzenzellen nicht vorkommt, oder das in der konkreten räumlichen Anordnung nicht natürlicherweise in Wildtyp-Pflanzenzellen vorkommt oder das an einem Ort im Genom der Wildtyp-Pflanzenzelle lokalisiert ist, an dem es natürlicherweise nicht vorkommt. Bevorzugt ist das fremde Nukleinsäuremolekül ein 10 rekombinantes Molekül, das aus verschiedenen Elementen besteht, deren Kombination oder spezifische räumliche Anordnung natürlicherweise in pflanzlichen Zellen nicht auftritt.

Prinzipiell kann ein fremdes Nucleinsäuremolekül jedes beliebige Nucleinsäuremolekül sein, das in der Pflanzenzelle oder Pflanze eine Erhöhung der 15 Aktivität eines OK1 Proteins und eines R1 Proteins bewirkt.

Unter dem Begriff „Genom“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung die Gesamtheit des in einer pflanzlichen Zelle vorliegenden Erbmaterials verstanden werden. Dem Fachmann ist bekannt, dass neben dem Zellkern auch andere 20 Kompartimente (z.B. Plastiden, Mitochondrien) Erbmaterial enthalten.

In einer weiteren Ausführungsform sind die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und die erfindungsgemäßen Pflanzen dadurch gekennzeichnet, dass mindestens ein fremdes Nucleinsäuremolekül ein OK1 Protein codiert, bevorzugt ein OK1 Protein 25 aus *Arabidopsis thaliana* oder ein OK1 Protein aus *Oryza sativa*.

In einer weiteren Ausführungsform codiert das fremde Nucleinsäuremolekül ein OK1 Protein mit der in SEQ ID NO 2 oder SEQ ID NO 4 angegebenen Aminosäuresequenz.

30

In einer weiteren Ausführungsform sind die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und die erfindungsgemäßen Pflanzen dadurch gekennzeichnet, dass mindestens ein

fremdes Nucleinsäuremolekül ein R1 Protein codiert, bevorzugt ein R1 Protein aus Kartoffel oder ein OK1 Protein aus *Oryza sativa*.

In einer weiteren Ausführungsform codiert das fremde Nucleinsäuremolekül ein R1

5 Protein aus Kartoffel mit der in GenBank Acc.: Y09533 (22-JUL-2003 Rel. 76, Last updated, Version 2) angegebenen Aminosäuresequenz. Die Nucleinsäuremoleküle und Aminosäuresequenzen codierend ein R1 Protein aus Kartoffel (GenBank Acc.: Y09533) ist durch Nennung der Referenzen ausdrücklich in die Beschreibung der vorliegenden Anmeldung aufgenommen.

10

In einer weiteren Ausführungsform sind die erfindungsgemäß Pflanzenzellen und die erfindungsgemäß Pflanzen dadurch gekennzeichnet, dass ein erstes fremdes Nucleinsäuremolekül ein R1 Protein codiert und ein zweites fremdes Nucleinsäuremolekül ein OK1 Protein codiert.

15

Bei den zur genetischen Modifikation in die Pflanzenzelle oder Pflanze eingebrachten fremden Nukleinsäuremolekülen kann es sich um ein einzelnes Nucleinsäuremolekül oder um mehrere Nucleinsäuremoleküle handeln. Es kann sich daher sowohl um

- Nucleinsäuremoleküle handeln, die OK 1 Proteine codierende

20 Nucleinsäuresequenzen und R1 Proteine codierende Nucleinsäuresequenzen enthalten, als auch um Nucleinsäuremoleküle bei denen die OK 1 Proteine codierenden Nucleinsäuresequenzen und die R1 Proteine codierenden Nucleinsäuresequenzen auf verschiedenen Nucleinsäuremolekülen vorliegen. Die ein OK1 Protein codierenden Nucleinsäuresequenzen und die ein R1 Protein 25 codierenden Nucleinsäuresequenzen können beispielsweise in einem Vektor, Plasmid oder linearen Nucleinsäuremolekül gleichzeitig enthalten sein, oder aber Bestandteile von zwei jeweils voneinander getrennten Vektoren, Plasmiden oder linearen Nucleinsäuremolekülen sein.

Liegen die ein OK1 Protein codierenden Nucleinsäuresequenzen und die ein R1

30 Protein codierenden Nucleinsäuresequenzen in zwei voneinander getrennten Nucleinsäuremolekülen vor, so können sie entweder zeitgleich („Cotransformation“) oder auch nacheinander, d.h. zeitlich aufeinander folgend („Supertransformation“) in

das Genom der Pflanzenzelle oder Pflanze eingeführt werden. Die voneinander getrennten Nukleinsäuremoleküle können auch in verschiedene individuelle Pflanzenzellen oder Pflanzen einer Spezies eingeführt werden. Es können dadurch Pflanzenzellen oder Pflanzen erzeugt werden, bei welchen die Aktivität von entweder

5 mindestens einem OK1 Protein oder aber mindestens einem R1 Protein erhöht ist. Solche Pflanzen können dann durch anschließendes Kreuzen der Pflanzen, bei welchen die Aktivität eines OK1 Proteins erhöht ist, mit solchen, bei welchen die Aktivität eines R1 Proteins erhöht ist, hergestellt werden.

10 Weiterhin können zur Einführung eines fremden Nukleinsäuremoleküls anstelle einer Wildtyp-Pflanzenzelle bzw. Wildtyp-Pflanze, eine Mutantenzelle bzw. eine Mutante, die sich dadurch auszeichnet, dass sie bereits eine erhöhte Aktivität eines OK1 Proteins oder eine erhöhte Aktivität eines R1 Proteins aufweiset, verwendet werden. Bei den Mutanten kann es sich sowohl um spontan (natürlich) auftretende Mutanten,

15 als auch um solche handeln, die durch den gezielten Einsatz von Mutagenen (wie z.B. chemische Agentien, ionisierende Strahlung) oder gentechnischen Verfahren (z.B. T-DNA-activation-tagging, Transposon-activation tagging, *in situ* activation, *in vivo*-Mutagenese) erzeugt wurden.

Erfindungsgemäße Pflanzenzellen oder erfindungsgemäße Pflanzen können daher

20 auch durch Einführung eines fremden Nucleinsäuremoleküls, welches zur Erhöhung der Aktivität eines R1 Proteins führt, in eine Mutantenzelle oder eine Mutante, die bereits eine erhöhte Aktivität eines OK1 Proteins aufweist, hergestellt werden.

Erfindungsgemäße Pflanzenzellen oder erfindungsgemäße Pflanzen können auch

25 durch Einführung eines fremden Nucleinsäuremoleküls, welches zur Erhöhung der Aktivität eines OK1 Proteins führt, in eine Mutantenzelle oder eine Mutante, die bereits eine erhöhte Aktivität eines R1 Proteins aufweist, hergestellt werden.

Erfindungsgemäße Pflanzenzellen oder erfindungsgemäße Pflanzen können auch

30 erzeugt werden, indem eine Mutante, bei welcher die Aktivität eines OK1 Proteins erhöht ist, mit einer Pflanze, die aufgrund der Einführung eines fremden Nucleinsäuremoleküls eine erhöhte Aktivität eines R1 Proteins aufweist, kreuzt. Ebenso ist es möglich, erfindungsgemäße Pflanzenzellen oder erfindungsgemäße Pflanzen zu erzeugen, indem man eine Mutante, bei welcher die Aktivität eines R1

Proteins erhöht ist, mit einer Pflanze, die aufgrund der Einführung eines fremden Nucleinsäuremoleküls eine erhöhte Aktivität eines OK1 Proteins aufweist, kreuzt.

Für die Einführung von DNA in eine pflanzliche Wirtszelle steht eine Vielzahl von

5 Techniken zur Verfügung. Diese Techniken umfassen die Transformation pflanzlicher Zellen mit T-DNA unter Verwendung von *Agrobacterium tumefaciens* oder *Agrobacterium rhizogenes* als Transformationsmittel, die Fusion von Protoplasten, die Injektion, die Elektroporation von DNA, die Einbringung der DNA mittels des biolistischen Ansatzes sowie weitere Möglichkeiten.

10 Die Verwendung der Agrobakterien-vermittelten Transformation von Pflanzenzellen ist intensiv untersucht und ausreichend in EP 120516; Hoekema, IN: The Binary Plant Vector System Offsetdrukkerij Kanters B.V. Albllasserdam (1985), Chapter V; Fraley et al., Crit. Rev. Plant Sci. 4, 1-46 und bei An et al. EMBO J. 4, (1985), 277-287 beschrieben worden. Für die Transformation von Kartoffel, siehe z.B. Rocha-

15 Sosa et al., EMBO J. 8, (1989), 29-33).

Auch die Transformation monokotyler Pflanzen mittels auf *Agrobacterium* Transformation basierender Vektoren wurde beschrieben (Chan et al., Plant Mol. Biol. 22, (1993), 491-506; Hiei et al., Plant J. 6, (1994) 271-282; Deng et al, Science 20 in China 33, (1990), 28-34; Wilmink et al., Plant Cell Reports 11, (1992), 76-80; May et al., Bio/Technology 13, (1995), 486-492; Conner und Domisse, Int. J. Plant Sci. 153 (1992), 550-555; Ritchie et al, Transgenic Res. 2, (1993), 252-265). Alternatives System zur Transformation von monokotylen Pflanzen ist die Transformation mittels des biolistischen Ansatzes (Wan und Lemaux, Plant Physiol. 104, (1994), 37-48; 25 Vasil et al., Bio/Technology 11 (1993), 1553-1558; Ritala et al., Plant Mol. Biol. 24, (1994), 317-325; Spencer et al., Theor. Appl. Genet. 79, (1990), 625-631), die Protoplastentransformation, die Elektroporation von partiell permeabilisierten Zellen, die Einbringung von DNA mittels Glasfasern. Insbesondere die Transformation von Mais wird in der Literatur mehrfach beschrieben (vgl. z. B. WO95/06128, 30 EP0513849, EP0465875, EP0292435; Fromm et al., Biotechnology 8, (1990), 833-844; Gordon-Kamm et al., Plant Cell 2, (1990), 603-618; Koziel et al., Biotechnology 11 (1993), 194-200; Moroc et al., Theor. Appl. Genet. 80, (1990), 721-726).

Auch die erfolgreiche Transformation anderer Getreidearten wurde bereits beschrieben, z.B. für Gerste (Wan und Lemaux, s.o.; Ritala et al., s.o.; Krens et al., Nature 296, (1982), 72-74) und für Weizen (Nehra et al., Plant J. 5, (1994), 285-297; Becker et al., 1994, Plant Journal 5, 299-307). Alle vorstehenden Methoden sind im

5 Rahmen der vorliegenden Erfindung geeignet.

Pflanzenzellen und Pflanzen, die durch Einführung eines OK1 Proteins und/oder eines R1 Proteins genetisch modifiziert sind, lassen sich von Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen unter anderem dadurch unterscheiden, dass sie ein fremdes

10 Nucleinsäuremolekül enthalten, das natürlicherweise in Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen nicht vorkommt oder dadurch, dass ein solches Molekül an einem Ort im Genom der erfindungsgemäßen Pflanzenzelle oder im Genom der erfindungsgemäßen Pflanze integriert vorliegt, an dem es bei Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen nicht vorkommt, d.h. in einer anderen genomischen

15 Umgebung. Ferner lassen sich derartige erfindungsgemäße Pflanzenzellen und erfindungsgemäße Pflanzen von Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen dadurch unterscheiden, dass sie mindestens eine Kopie des fremden Nucleinsäuremoleküls stabil integriert in ihr Genom enthalten, gegebenenfalls zusätzlich zu natürlicherweise in den Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen

20 vorkommenden Kopien eines solchen Moleküls. Handelt es sich bei dem (den) in die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen oder erfindungsgemäßen Pflanzen eingeführten fremden Nucleinsäuremolekül(en) um zusätzliche Kopien zu bereits natürlicherweise in den Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen vorkommenden Molekülen, so lassen sich die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und die erfindungsgemäßen

25 Pflanzen von Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen insbesondere dadurch unterscheiden, dass diese zusätzliche(n) Kopie(n) an Orten im Genom lokalisiert ist (sind), an denen sie bei Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen nicht vorkommt (vorkommen). Dies lässt sich beispielsweise mit Hilfe einer Southern Blot-Analyse nachprüfen.

30 Weiterhin lassen sich die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und die erfindungsgemäßen Pflanzen von Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen vorzugsweise durch mindestens eines der folgenden Merkmale unterscheiden: Ist ein

eingeführtes fremde Nucleinsäuremolekül heterolog in Bezug auf die Pflanzenzelle oder Pflanze, so weisen die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen oder erfindungsgemäßen Pflanzen Transkripte der eingeführten Nucleinsäuremoleküle auf. Diese lassen sich z. B. durch Northern-Blot-Analyse oder durch RT-PCR

5 (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) nachweisen. Erfindungsgemäße Pflanzenzellen und erfindungsgemäße Pflanzen, die ein Antisense- und/oder ein RNAi-Transkript exprimieren, können z.B. mit Hilfe von spezifischen Nucleinsäure-Sonden, die komplementär zur der für das Protein codierenden (natürlich in der Pflanzenzelle vorkommenden) RNA sind, nachgewiesen werden. Vorzugsweise 10 enthalten die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und die erfindungsgemäßen Pflanzen ein Protein, das durch ein eingeführtes Nucleinsäuremolekül codiert wird. Dies kann z. B. durch immunologische Methoden, insbesondere durch eine Western-Blot-Analyse nachgewiesen werden.

Ist ein eingeführtes fremde Nucleinsäuremolekül homolog in Bezug auf die 15 Pflanzenzelle oder Pflanze, können die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und die erfindungsgemäßen Pflanzen von Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen beispielsweise aufgrund der zusätzlichen Expression der eingeführten fremden Nucleinsäuremoleküle unterschieden werden. Die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und die erfindungsgemäßen Pflanzen enthalten vorzugsweise 20 Transkripte der fremden Nucleinsäuremoleküle. Dies kann z. B. durch Northern-Blot-Analyse oder mit Hilfe der so genannten quantitativen PCR nachgewiesen werden.

In einer weiteren Ausführungsform handelt es sich bei den erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und bei den erfindungsgemäßen Pflanzen um transgene 25 Pflanzenzellen bzw. transgene Pflanzen.

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung erfindungsgemäße Pflanzenzellen und erfindungsgemäße Pflanzen, wobei das fremde Nucleinsäuremolekül codierend ein OK1 Protein ausgewählt ist, aus der 30 Gruppe bestehend aus

- Nucleinsäuremolekülen, die ein Protein mit der unter SEQ ID NO 2 oder SEQ ID NO 4 angegebenen Aminosäuresequenz codieren;

b) Nucleinsäuremolekülen, die ein Protein codieren, das die Aminosäuresequenz umfasst, die von der Insertion in Plasmid A.t.-OK1-pGEM oder der Insertion in Plasmid pMI50 codiert wird;

c) Nucleinsäuremolekülen, die ein Protein codieren, dessen Sequenz eine 5 Identität von mindestens 60% zu der unter SEQ ID NO 2 oder SEQ ID NO 4 angegebenen Aminosäuresequenz aufweisen;

d) Nucleinsäuremolekülen, die ein Protein codieren, dessen Sequenz eine 10 Identität von mindestens 60% zu der Aminosäuresequenz aufweist; die von der codierenden Region der Insertion in Plasmid A.t.-OK1-pGEM oder von der codierenden Region der Insertion in Plasmid pMI50 codiert wird;

e) Nucleinsäuremolekülen, die die unter SEQ ID NO 1 oder SEQ ID NO 3 15 dargestellte Nucleotidsequenz oder eine komplementäre Sequenz umfassen;

f) Nucleinsäuremolekülen, die die Nucleotidsequenz der im Plasmid A.t.-OK1- pGEM oder Plasmid pMI50 enthaltenen Insertion umfassen;

g) Nucleinsäuremolekülen, welche zu den unter a), b), e) oder f) beschriebenen 20 Nucleinsäuresequenzen eine Identität von mindestens 70% aufweisen;

h) Nucleinsäuremolekülen, welche mit mindestens einem Strang der unter a), b), ,e) oder f) beschriebenen Nucleinsäuremolekülen unter stringenten Bedingungen hybridisieren;

i) Nucleinsäuremolekülen, deren Nucleotidsequenz aufgrund der Degeneration 25 des genetischen Codes von der Sequenz der unter a), b), e) oder f) genannten Nucleinsäuremoleküle abweicht; und

j) Nucleinsäuremolekülen, die Fragmente, allelische Varianten und/oder Derivate der unter a), b), c), d), e), f), g), h) oder i) genannten Nucleinsäuremoleküle darstellen.

Die in SEQ ID NO 1 dargestellte Nucleinsäuresequenz ist eine cDNA Sequenz, die die codierende Region für ein OK1 Protein aus *Arabidopsis thaliana* und die in SEQ ID NO 3 dargestellte Nucleinsäuresequenz ist eine cDNA Sequenz, die die 30 codierende Region für ein OK1 Protein aus *Oryza sativa* umfasst.

Das Plasmid A.t.-OK1-pGEM, enthaltend eine cDNA, die ein OK1 Protein aus *Arabidopsis thaliana* codiert und das Plasmid pMI50, enthaltend eine cDNA, die ein

OK1 Protein aus *Oryza sativa* codiert, wurden nach dem Budapester Vertrag hinterlegt bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, 38124 Braunschweig, Deutschland. Die in SEQ ID NO 2 dargestellte Aminosäuresequenz kann von der codierenden Region der in Plasmid 5 A.t.-OK1-pGEM integrierten cDNA Sequenz abgeleitet werden und codiert für ein OK1 Protein aus *Arabidopsis thaliana*. Die in SEQ ID NO 4 dargestellte Aminosäuresequenz kann von der codierenden Region der in Plasmid pMI50 integrierten cDNA Sequenz abgeleitet werden und codiert für ein OK1 Protein aus 10 *Oryza sativa*. Die vorliegende Erfindung betrifft daher auch Nucleinsäuremoleküle, die ein Protein mit der enzymatischen Aktivität eines OK1 Proteins codieren, das die 15 Aminosäuresequenz umfasst, die von der Insertion in Plasmid A.t.-OK1-pGEM oder die von der Insertion in Plasmid pMI50 codiert wird, wobei das codierte Protein eine Identität von mindestens 70% bevorzugt von mindestens 80%, besonders bevorzugt von mindestens 90% und insbesondere bevorzugt von 95% zu der 20 Aminosäuresequenz, die von der Insertion in A.t.-OK1-pGEM oder pMI50 abgeleitet werden kann, aufweist.

Die vorliegende Erfindung betrifft auch Nucleinsäuremoleküle, die ein OK1 Protein codieren und die codierende Region der unter SEQ ID NO 1 oder SEQ ID NO 3 dargestellten Nucleotidsequenzen oder zu diesen komplementäre Sequenzen 25 umfassen, Nucleinsäuremoleküle, die die codierende Region der Nucleotidsequenz der im Plasmid A.t.-OK1-pGEM oder Plasmid pMI50 enthaltenen Insertion umfassen und Nucleinsäuremoleküle, die zu den genannten Nucleinsäuremolekülen eine Identität von mindestens 70%, bevorzugt von mindestens 80%, besonders bevorzugt von mindestens 90% und insbesondere bevorzugt von mindestens 95% aufweisen. 30 Mit Hilfe der Sequenzinformation erfindungsgemäßer Nucleinsäuremoleküle bzw. mit Hilfe eines erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküls ist es dem Fachmann nun möglich, homologe Sequenzen aus anderen Pflanzenspezies, vorzugsweise aus Stärke speichernden Pflanzen, bevorzugt aus Pflanzenspezies der Gattung *Oryza*, insbesondere *Oryza sativa* oder aus *Arabidopsis thaliana* zu isolieren. Dies kann beispielsweise mit Hilfe konventioneller Methoden, wie dem Durchmustern von cDNA oder genomischen Banken mit geeigneten Hybridisierungsproben erfolgen. Dem Fachmann ist bekannt, dass die Isolierung homologer Sequenzen auch mit Hilfe von

(degenerierten) Oligonucleotiden und der Verwendung von PCR basierten Methoden erfolgen kann.

Auch die Durchmusterung von Datenbanken wie sie z.B. von EMBL (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/index.htm>) oder NCBI (National Center for Biotechnology

- 5 Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) zur Verfügung gestellt werden, kann zur Identifizierung von homologen Sequenzen, die für OK1 Protein codieren, dienen. Hierbei wird eine oder werden mehrere Sequenzen als so genannte Abfrage (= query) vorgegeben. Diese Abfragesequenz wird dann mittels statistischen Computerprogrammen mit Sequenzen, die in den ausgewählten Datenbanken
- 10 enthalten sind, verglichen. Solche Datenbankabfragen (z.B. blast- oder fasta searches) sind dem Fachmann bekannt und können bei verschiedenen Anbietern durchgeführt werden.

Wird eine solche Datenbankabfrage z.B. beim NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) durchgeführt, so sollen die

- 15 Standardeinstellungen, die für die jeweilige Vergleichsanfrage vorgegeben sind, benutzt werden. Für Proteinsequenzvergleiche (blastp) sind diese folgende Einstellungen: Limit entrez = nicht aktiviert; Filter = low complexity aktiviert; Expect value = 10; word size = 3; Matrix = BLOSUM62; Gap costs: Existence = 11, Extension = 1.
- 20 Für Nucleinsäuresequenzvergleich (blastn) sind folgende Parameter einzustellen: Limit entrez = nicht aktiviert; Filter = low complexity aktiviert; Expect value = 10; word size = 11.

Bei einer solchen Datenbankrecherche können z.B. die in der vorliegenden Erfindung beschriebenen Sequenzen als Abfragesequenz (query) verwendet werden, um

- 25 weitere Nucleinsäuremoleküle und/oder Proteine zu identifizieren, die ein OK1 Protein codieren.

Mit Hilfe der beschriebenen Methoden ist es auch möglich, erfindungsgemäße Nucleinsäuremoleküle zu identifizieren und/oder zu isolieren, die mit der unter SEQ ID NO 1 oder unter SEQ ID NO 3 angegebenen Sequenz hybridisieren und die ein

- 30 OK1 Protein codieren.

Der Begriff "Hybridisierung" bedeutet im Rahmen der vorliegenden Erfindung eine Hybridisierung unter konventionellen Hybridisierungsbedingungen, vorzugsweise

unter stringenten Bedingungen, wie sie beispielsweise in Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2. Aufl. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY) beschrieben sind. Besonders bevorzugt bedeutet "Hybridisierung" eine Hybridisierung unter den folgenden Bedingungen:

5 Hybridisierungspuffer:

2xSSC; 10xDenhardt-Lösung (Fikoll 400+PEG+BSA; Verhältnis 1:1:1); 0,1% SDS; 5 mM EDTA; 50 mM Na₂HPO₄; 250 µg/ml Heringssperma DNA; 50 µg/ml tRNA; oder 25 M Natriumphosphatpuffer pH 7,2; 1 mM EDTA; 7% SDS

Hybridisierungstemperatur:

10 T=65 bis 68°C

Waschpuffer: 0,1xSSC; 0,1% SDS

Waschtemperatur: T=65 bis 68°C.

Nucleinsäuremoleküle, die mit den erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekülen 15 hybridisieren, können prinzipiell aus jeder beliebigen Pflanzenspezies stammen, die ein entsprechendes Protein codiert, vorzugsweise stammen sie aus Stärke speichernden Pflanzen, bevorzugt aus Spezies der (systematischen) Familie Poacea, insbesondere bevorzugt aus Spezies der Gattung Oryza.

Nucleinsäuremoleküle, die mit den erfindungsgemäßen Molekülen hybridisieren, 20 können z.B. aus genomischen oder aus cDNA-Bibliotheken isoliert werden. Die Identifizierung und Isolierung derartiger Nucleinsäuremoleküle kann dabei unter Verwendung der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle oder Teile dieser Moleküle bzw. der reversen Komplemente dieser Moleküle erfolgen, z.B. mittels Hybridisierung nach Standardverfahren (siehe z.B. Sambrook et al., 1989, Molecular 25 Cloning, A Laboratory Manual, 2. Aufl. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY) oder durch Amplifikation mittels PCR.

Als Hybridisierungsprobe können z.B. Nucleinsäuremoleküle verwendet werden, die exakt die oder im Wesentlichen die unter SEQ ID NO 1 oder SEQ ID NO 3 angegebene Nucleotidsequenz oder Teile dieser Sequenzen aufweisen. Bei den als 30 Hybridisierungsprobe verwendeten Fragmenten kann es sich auch um synthetische Fragmente oder Oligonucleotide handeln, die mit Hilfe der gängigen Synthesetechniken hergestellt wurden und deren Sequenz im wesentlichen mit der

eines erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküls übereinstimmt. Hat man Gene identifiziert und isoliert, die mit den erfindungsgemäßen Nucleinsäuresequenzen hybridisieren, sollte eine Bestimmung der Sequenz und eine Analyse der Eigenschaften der von dieser Sequenz codierten Proteine erfolgen, um festzustellen,

5 ob es sich um ein OK1 Protein handelt. Hierzu eignen sich insbesondere Homologievergleiche auf der Ebene der Nucleinsäure- oder Aminosäuresequenz sowie die Bestimmung der enzymatischen Aktivität. Die Aktivität eines OK1 Proteins kann z.B. wie oben oder unter Allgemeinen Methoden Punkt 11 beschrieben, erfolgen. Eine bevorzugte Bindungsaffinität zu P-Stärke im Vergleich zu nicht-
10 phosphorylierter-Stärke, und Autophosphorylierung eines OK1 Proteins können nach den oben bereits und unter Allgemeine Methoden Punkte 8 und 12 beschriebenen Methoden nachgewiesen werden.

Die mit den erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekülen hybridisierenden Moleküle umfassen insbesondere Fragmente, Derivate und allelische Varianten der
15 erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle, die ein OK1 Protein aus Pflanzen, vorzugsweise aus Stärke speichernden Pflanzen, bevorzugt aus Spezies der (systematischen) Familie *Poacea*, insbesondere bevorzugt aus Spezies der Gattung *Oryza* codieren. Der Begriff „Derivat“ bedeutet im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung, dass die Sequenzen dieser Moleküle sich von den
20 Sequenzen der oben beschriebenen Nucleinsäuremoleküle an einer oder mehreren Positionen unterscheiden und einen hohen Grad an Identität zu diesen Sequenzen aufweisen. Die Abweichungen zu den oben beschriebenen Nucleinsäuremolekülen können dabei z.B. durch Deletion, Addition, Substitution, Insertion oder Rekombination entstanden sein.

25

Der Begriff „Identität“ bedeutet im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung eine Sequenzidentität über die gesamte Länge der codierenden Region von mindestens 60%, insbesondere eine Identität von mindestens 80%, vorzugsweise über 80%, besonders bevorzugt über 90% und insbesondere von mindestens 95%.

30 Unter dem Begriff „Identität“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung die Anzahl der übereinstimmenden Aminosäuren/Nucleotide (Identität) mit anderen Proteinen/Nucleinsäuren, ausgedrückt in Prozent verstanden werden. Bevorzugt wird

die Identität durch Vergleiche der SEQ ID NO 2 oder SEQ ID NO 4 für Aminosäuren oder SEQ. ID NO 1 oder SEQ ID NO 3 für Nucleinsäuren zu anderen Proteinen/Nucleinsäuren mit Hilfe von Computerprogrammen ermittelt. Weisen Sequenzen, die miteinander verglichen werden, unterschiedliche Längen auf, ist die

5 Identität so zu ermitteln, dass die Anzahl an Aminosäuren, welche die kürzere Sequenz mit der längeren Sequenz gemeinsam hat, den prozentualen Anteil der Identität bestimmt. Vorzugsweise wird die Identität mittels des bekannten und der Öffentlichkeit zur Verfügung stehenden Computerprogramms ClustalW (Thompson et al., Nucleic Acids Research 22 (1994), 4673-4680) ermittelt. ClustalW wird öffentlich
10 zur Verfügung gestellt von Julie Thompson (Thompson@EMBL-Heidelberg.DE) und Toby Gibson (Gibson@EMBL-Heidelberg.DE), European Molecular Biology Laboratory, Meyerhofstrasse 1, D 69117 Heidelberg, Germany. ClustalW kann ebenfalls von verschiedenen Internetseiten, u.a. beim IGBMC (Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, B.P.163, 67404 Illkirch Cedex, France; 15 ftp://ftp-igbmc.u-strasbg.fr/pub/) und beim EBI (ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/software/) sowie bei allen gespiegelten Internetseiten des EBI (European Bioinformatics Institute, Wellcome Trust Genome Campus, Hinxton, Cambridge CB10 1SD, UK), heruntergeladen werden.

Vorzugsweise wird das ClustalW Computerprogramm der Version 1.8 benutzt, um
20 die Identität zwischen erfindungsgemäßen Proteinen und anderen Proteinen zu bestimmen. Dabei sind folgende Parameter einzustellen: KTUPLE=1, TOPDIAG=5, WINDOW=5, PAIRGAP=3, GAPOpen=10, GAPEXTEND=0.05, GAPDIST=8, MAXDIV=40, MATRIX=GONNET, ENDGAPS(OFF), NOPGAP, NOHGAP.

Vorzugsweise wird das ClustalW Computerprogramm der Version 1.8 benutzt, um
25 die Identität zwischen z.B. der Nucleotidsequenz der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle und der Nucleotidsequenz von anderen Nucleinsäuremolekülen zu bestimmen. Dabei sind folgende Parameter einzustellen: KTUPLE=2, TOPDIAGS=4, PAIRGAP=5, DNAMATRIX:IUB, GAPOpen=10, GAPEXT=5, MAXDIV=40, TRANSITIONS: unweighted.

30

Identität bedeutet ferner, dass funktionelle und/oder strukturelle Äquivalenz zwischen den betreffenden Nucleinsäuremolekülen oder den durch sie codierten Proteinen,

besteht. Bei den Nucleinsäuremolekülen, die homolog zu den oben beschriebenen Molekülen sind und Derivate dieser Moleküle darstellen, handelt es sich in der Regel um Variationen dieser Moleküle, die Modifikationen darstellen, die dieselbe biologische Funktion ausüben. Es kann sich dabei sowohl um natürlicherweise 5 auftretende Variationen handeln, beispielsweise um Sequenzen aus anderen Pflanzenspezies oder um Mutationen, wobei diese Mutationen auf natürliche Weise aufgetreten sein können oder durch gezielte Mutagenese eingeführt wurden. Ferner kann es sich bei den Variationen um synthetisch hergestellte Sequenzen handeln. Bei den allelischen Varianten kann es sich sowohl um natürlich auftretende Varianten 10 handeln, als auch um synthetisch hergestellte oder durch rekombinante DNA-Techniken erzeugte Varianten. Eine spezielle Form von Derivaten stellen z.B. Nucleinsäuremoleküle dar, die auf Grund der Degeneration des genetischen Codes von erfindungsgemäßigen Nucleinsäuremolekülen abweichen.

15 Die von den verschiedenen Derivaten der erfindungsgemäßigen Nucleinsäuremoleküle codierten Proteine weisen bestimmte gemeinsame Charakteristika auf. Dazu können z.B. biologische Aktivität, Substratspezifität, Molekulargewicht, immunologische Reaktivität, Konformation etc. gehören, sowie physikalische Eigenschaften wie z.B. das Laufverhalten in Gelelektrophoresen, chromatographisches Verhalten, 20 Sedimentationskoeffizienten, Löslichkeit, spektroskopische Eigenschaften, Stabilität; pH-Optimum, Temperatur-Optimum etc.. Bevorzugte Eigenschaften eines OK1 Proteins wurden oben bereits im Detail erörtert und sind hier entsprechend anzuwenden.

25 Die erfindungsgemäßigen Nucleinsäuremoleküle können beliebige Nucleinsäuremoleküle sein, insbesondere DNA- oder RNA-Moleküle, beispielsweise cDNA, genomische DNA, mRNA etc. Sie können natürlich vorkommende Moleküle sein, oder durch gentechnische oder chemische Syntheseverfahren hergestellte Moleküle. Sie können einzelsträngige Moleküle sein, die entweder den codierenden 30 oder den nicht codierenden Strang enthalten, oder doppelsträngige Moleküle.

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung erfindungsgemäße Pflanzenzellen und erfindungsgemäße Pflanzen, wobei das fremde Nucleinsäuremolekül codierend ein R1 Protein ausgewählt ist, aus der Gruppe bestehend aus

- 5 a) Nucleinsäuremolekülen, die ein Protein mit der unter SEQ ID NO 7, SEQ ID NO 9, SEQ ID NO 11, SEQ ID NO 13, SEQ ID NO 15 oder SEQ ID NO 17 angegebenen Aminosäuresequenz codieren,
- b) Nucleinsäuremolekülen, die die unter SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 8, SEQ ID NO 10, SEQ ID NO 12, SEQ ID NO 14 oder SEQ ID NO 16 dargestellte Nucleotidsequenz oder eine komplementäre Sequenz umfassen;
- 10 c) Nucleinsäuremolekülen, deren Nucleotidsequenz aufgrund der Degeneration des genetischen Codes von der Sequenz der unter a) oder b) genannten Nucleinsäuremoleküle abweicht;
- d) Nucleinsäuremolekülen, welche zu den unter a) oder b) beschriebenen Nucleinsäuresequenzen eine Identität von mindestens 70% aufweisen und
- e) Nucleinsäuremolekülen, welche mit mindestens einem Strang der unter a) oder b) beschriebenen Nucleinsäuremolekülen unter stringenten Bedingungen hybridisieren.

- 20 In einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung erfindungsgemäße Pflanzenzellen und erfindungsgemäße Pflanzen, wobei das fremde Nucleinsäuremolekül ausgewählt ist, aus der Gruppe bestehend aus
 - a) T-DNA Molekülen, die durch Integration in das pflanzliche Genom zu einer Erhöhung der Expression eines OK1 Gens und/oder eines R1 Gens führen (T-DNA activation tagging);
 - 25 b) DNA Molekülen, die Transposons enthalten, die durch Integration in das pflanzliche Genom zu einer Erhöhung der Expression eines OK1 Gens und/oder eines R1 Gens führen (Transposon activation tagging);
 - c) DNA Molekülen, die ein OK1 Protein und/oder ein R1 Protein codieren und mit regulatorischen Sequenzen verknüpft sind, die die Transkription in pflanzlichen Zellen gewährleisten und zu einer Erhöhung einer OK1 Protein und/oder R1 Protein Aktivität in der Zelle führen,

- d) Mittels *in vivo*-Mutagenese eingeführte Nucleinsäuremoleküle, die zu einer Mutation oder einer Insertion einer heterologen Sequenz in mindestens einem endogenen OK1 Protein codierenden Gen führen, wobei die Mutation oder Insertion eine Erhöhung der Expression eines OK1 Protein codierenden Gens bewirkt.
- 5 e) Mittels *in vivo*-Mutagenese eingeführte Nucleinsäuremoleküle, die zu einer Mutation oder einer Insertion einer heterologen Sequenz in mindestens einem endogenen R1 Protein codierenden Gen führen, wobei die Mutation oder Insertion eine Erhöhung der Expression eines R1 Protein codierenden Gens bewirkt.
- 10

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung können erfindungsgemäße Pflanzenzellen und erfindungsgemäße Pflanzen auch durch die Verwendung der so genannten Insertionsmutagenese (Übersichtsartikel: Thorneycroft et al., 2001, Journal of experimental Botany 52 (361), 1593-1601) hergestellt werden. Unter Insertionsmutagenese ist im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung insbesondere das Inserieren von Transposons oder so genannter Transfer DNA (T-DNA) in ein Gen oder in die Nähe eines Gens, codierend ein OK1 Protein und/oder ein codierend ein R1 Protein zu verstehen, wobei dadurch die Aktivität eines OK1 Proteins und/oder eines R1 Proteins in der betreffenden Zelle erhöht wird.

Bei den Transposons kann es sich dabei sowohl um solche handeln, die in der Zelle natürlicherweise vorkommen (endogene Transposons), als auch um solche, die natürlicherweise nicht in besagter Zelle vorkommen, sondern mittels gentechnischer Methoden, wie z.B. Transformation der Zelle, in die Zelle eingeführt wurden (heterologe Transposons). Die Veränderung der Expression von Genen mittels Transposons ist dem Fachmann bekannt. Eine Übersicht über die Nutzung von endogenen und heterologen Transposons als Werkzeuge in der Pflanzenbiotechnologie ist in Ramachandran und Sundaresan (2001, Plant Physiology and Biochemistry 39, 234-252) dargestellt.

Die T-DNA Insertionsmutagenese beruht darauf, dass bestimmte Abschnitte (T-DNA) von Ti-Plasmiden aus Agrobacterium in das Genom von pflanzlichen Zellen integrieren können. Der Ort der Integration in das pflanzliche Chromosom ist dabei nicht festgelegt, sondern kann an jeder beliebigen Stelle erfolgen. Integriert die T-

5 DNA in einen Abschnitt oder in die Nähe eines Abschnittes des Chromosoms, der eine Genfunktion darstellt, so kann dieses zur Erhöhung der Genexpression und damit auch zur Änderung der Aktivität eines durch das betreffende Gen codierten Proteins führen.

Die in das Genom inserierten Sequenzen (insbesondere Transposons oder T-DNA) 10 zeichnen sich dabei dadurch aus, dass sie Sequenzen enthalten, die zu einer Aktivierung von regulatorischen Sequenzen eines OK1 Gens führen ("activation tagging").

15 Erfindungsgemäße Pflanzenzellen und Pflanzen können mit Hilfe der Methode des so genannten "activation taggings" (siehe z. B. Walden et al., Plant J. (1991), 281-288; Walden et al., Plant Mol. Biol. 26 (1994), 1521-1528) erzeugt werden. Diese Methode beruht auf der Aktivierung endogener Promotoren durch "enhancer"-Sequenzen, wie z.B. dem Enhancer des 35S RNA-Promoters des Blumenkohlmosaikvirus oder dem Octopinsynthase-Enhancers.

20 Unter dem Begriff „T-DNA activation tagging“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung ein T-DNA Fragment verstanden werden, das "enhancer"-Sequenzen enthält und durch Integration in das Genom einer Pflanzenzelle zu der Erhöhung der Aktivität mindestens eines OK1 Proteins und/oder mindestens eines 25 R1 Proteins führt.

Unter dem Begriff „Transposon activation tagging“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung ein Transposon verstanden werden, das "enhancer"-Sequenzen enthält und durch Integration in das Genom einer Pflanzenzelle zu der 30 Erhöhung der Aktivität mindestens eines OK1 Proteins und/oder mindestens eines R1 Proteins führt.

In einer weiteren Ausführungsform sind die erfindungsgemäßen DNA Moleküle, die ein OK1 Protein und/oder ein R1 Protein codieren, mit regulatorischen Sequenzen verknüpft, die die Transkription in pflanzlichen Zellen initiieren (Promotoren) und zu einer Erhöhung einer OK1 Protein und/oder R1 Protein Aktivität in der Zelle führen.

5 Die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle liegen dabei zu den regulatorischen Sequenzen in „sense“-Orientierung vor.

Zur Expression von erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekülen, die ein OK1 Protein und/oder R1 Protein codieren, werden diese vorzugsweise mit regulatorischen DNA-

10 Sequenzen verknüpft, die die Transkription in pflanzlichen Zellen gewährleisten. Hierzu zählen insbesondere Promotoren. Generell kommt für die Expression jeder in pflanzlichen Zellen aktive Promotor in Frage.

Der Promotor kann dabei so gewählt sein, dass die Expression konstitutiv erfolgt oder nur in einem bestimmten Gewebe, zu einem bestimmten Zeitpunkt der Pflanzenentwicklung oder zu einem durch äußere Einflüsse determinierten Zeitpunkt. Sowohl in Bezug auf die Pflanze als auch in Bezug auf das Nucleinsäuremolekül kann der Promotor homolog oder heterolog sein.

Geeignete Promotoren sind z.B. der Promotor der 35S RNA des Cauliflower Mosaic Virus und der Ubiquitin-Promotor aus Mais für eine konstitutive Expression, der Patatingen-Promotor B33 (Rocha-Sosa et al., EMBO J. 8 (1989), 23-29) für eine knollenspezifische Expression in Kartoffeln oder ein Promotor, der eine Expression lediglich in photosynthetisch aktiven Geweben sicherstellt, z.B. der ST-LS1-Promotor (Stockhaus et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 (1987), 7943-7947; Stockhaus et al., EMBO J. 8 (1989), 2445-2451) oder für eine endosperm-spezifische Expression der HMG-Promotor aus Weizen, der USP-Promotor, der Phaseolinpromotor, Promotoren von Zein-Genen aus Mais (Pedersen et al., Cell 29 (1982), 1015-1026; Quattroccio et al., Plant Mol. Biol. 15 (1990), 81-93), Glutelin-Promotor (Leisy et al., Plant Mol. Biol. 14 (1990), 41-50; Zheng et al., Plant J. 4 (1993), 357-366; Yoshihara et al., FEBS Lett. 383 (1996), 213-218) oder Shrunken-1 Promotor (Werr et al., EMBO J. 4 (1985), 1373-1380). Es können jedoch auch Promotoren verwendet werden, die nur zu einem durch äußere Einflüsse determinierten Zeitpunkt aktiviert werden (siehe beispielsweise WO 9307279). Von besonderem Interesse können hierbei

Promotoren von heat-shock Proteinen sein, die eine einfache Induktion erlauben.

Ferner können samenspezifische Promotoren verwendet werden, wie z.B. der USP-Promoter aus *Vicia faba*, der eine samenspezifische Expression in *Vicia faba* und anderen Pflanzen gewährleistet (Fiedler et al., Plant Mol. Biol. 22 (1993), 669-679;

5 Bäumlein et al., Mol. Gen. Genet. 225 (1991), 459-467).

Ferner kann eine Terminationssequenz (Polyandenylierungssignal) vorhanden sein, die der Addition eines Poly-A-Schwanzes an das Transkript dient. Dem Poly-A-Schwanz wird eine Funktion bei der Stabilisierung der Transkripte beigemessen.

10 Derartige Elemente sind in der Literatur beschrieben (vgl. Gielen et al., EMBO J. 8 (1989), 23-29) und sind beliebig austauschbar.

Es können auch Intronsequenzen zwischen dem Promotor und der codierenden Region vorhanden sein. Solche Intronsequenzen können zur Stabilität der

15 Expression und zu einer erhöhten Expression in Pflanzen führen (Callis et al., 1987, Genes Devel. 1, 1183-1200; Luehrsen, and Walbot, 1991, Mol. Gen. Genet. 225, 81-93; Rethmeier, et al., 1997; Plant Journal. 12(4):895-899; Rose and Beliakoff, 2000, Plant Physiol. 122 (2), 535-542; Vasil et al., 1989, Plant Physiol. 91, 1575-1579; XU et al., 2003, Science in China Series C Vol.46 No.6, 561-569). Geeignete
20 Intronsequenzen sind beispielsweise das erste Intron des sh1-Gens aus Mais, das erste Intron des Poly-Ubiquitin Gens 1 aus Mais, das erste Intron des EPSPS Gens aus Reis oder eines der beiden ersten Introns des PAT1 Gens aus *Arabidopsis*.

Weiterhin können erfindungsgemäße Pflanzenzellen und erfindungsgemäße

25 Pflanzen mittels der so genannten "in situ-Aktivierung", hergestellt werden. Die eingeführte genetische Modifikation bewirkt dabei eine Veränderung der regulatorischen Sequenzen endogener OK1 Gene und/oder R1 Gene, was zu einer verstärkten Expression von OK1 Genen und/oder R1 Genen führt. Bevorzugt geschieht die Aktivierung eines OK1 Gens und/oder eines R1 Gens durch „in vivo“
30 Mutagenese eines Promotors oder von „enhancer“-Sequenzen eines endogenen OK1 Gens und/oder eines R1 Gens. Dabei kann z.B. ein Promotor oder eine „enhancer“-Sequenz durch Mutagenese derart verändert werden, dass die erzeugte

Mutation in erfindungsgemäßen Pflanzenzellen oder erfindungsgemäßen Pflanzen zu einer erhöhten Expression eines OK1 Gens und/oder R1 Gens führt im Vergleich zur Expression eines OK1 Gens und/oder eines R1 Gens in Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen. Die Mutation in einem Promotor oder einer „enhancer“-

5 Sequenz kann auch dazu führen, dass OK1 Gene und/oder R1 Gene in erfindungsgemäßen Pflanzenzellen oder erfindungsgemäßen Pflanzen zu einem Zeitpunkt exprimiert werden, zu welchem sie in Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen nicht exprimiert werden.

10 Unter dem Begriff „OK1 Gen“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung ein Nucleinsäuremolekül (cDNA, DNA) verstanden werden, das ein OK1 Protein, vorzugsweise ein OK1 Protein aus Stärke speichernden Pflanzen besonders bevorzugt, aus *Arabidopsis thaliana*, insbesondere bevorzugt aus Reis, codiert.

15 Unter dem Begriff „R1 Gen“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung ein Nucleinsäuremolekül (cDNA, DNA) verstanden werden, das ein R1 Protein, vorzugsweise ein R1 Protein aus Stärke speichernden Pflanzen besonders bevorzugt, aus *Arabidopsis thaliana*, insbesondere bevorzugt aus Reis, codiert.

20 Bei der so genannten "in vivo-Mutagenese" wird durch Transformation von Pflanzenzellen ein hybrides RNA-DNA-Oligonucleotid ("Chimeroplast") in Pflanzenzellen eingeführt (Kipp, P.B. et al., Poster Session beim " 5th International Congress of Plant Molecular Biology, 21.-27. September 1997, Singapore; R. A. Dixon und C.J. Arntzen, Meeting report zu "Metabolic Engineering in Transgenic

25 Plants", Keystone Symposia, Copper Mountain, CO, USA, TIBTECH 15, (1997), 441-447; internationale Patentanmeldung WO 9515972; Kren et al., Hepatology 25, (1997), 1462-1468; Cole-Strauss et al., Science 273, (1996), 1386-1389; Beetham et al., 1999, PNAS 96, 8774-8778).

Ein Teil der DNA-Komponente des RNA-DNA-Oligonucleotids ist homolog zu einer

30 Nucleinsäuresequenz eines endogenen OK1 Gens und/oder R1 Gens, weist jedoch im Vergleich zur Nucleinsäuresequenz eines endogenen OK1 Gens und/oder R1

Gens eine Mutation auf oder enthält eine heterologe Region, die von den homologen Regionen umschlossen ist.

Durch Basenpaarung der homologen Regionen des RNA-DNA-Oligonucleotids und des endogenen Nukleinsäuremoleküls, gefolgt von homologer Rekombination, kann

5 die in der DNA-Komponente des RNA-DNA-Oligonucleotids enthaltene Mutation oder heterologe Region in das Genom einer Pflanzenzelle übertragen werden. Dies führt zu einer Erhöhung der Aktivität eines oder mehrerer OK1 Proteine.

Alle diese Methoden beruhen auf der Einführung eines fremden
10 Nucleinsäuremoleküls in das Genom einer Pflanzenzelle oder Pflanze und sind daher grundsätzlich zu Herstellung erfindungsgemäßer Pflanzenzellen und erfindungsgemäßer Pflanzen geeignet.

Es wurde überraschenderweise gefunden, dass erfindungsgemäße Pflanzenzellen
15 und erfindungsgemäße Pflanzen eine modifizierte Stärke synthetisieren im Vergleich zu Stärke von entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen.

Die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und erfindungsgemäßen Pflanzen
20 synthetisieren eine modifizierte Stärke, die in ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften, insbesondere dem Gehalt an Stärkephosphat und/oder der Phosphatverteilung im Vergleich zu in Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen synthetisierter Stärke verändert ist, so dass diese für spezielle Verwendungszwecke besser geeignet ist.

25

Da bisher keine Enzyme beschrieben sind, die ausschließlich P-Stärke phosphorylieren, war es bisher auch nicht möglich, den Gehalt an Stärkephosphat von bereits phosphorylierter Stärke in Pflanzen über ein gewisses Maß hinaus zu steigern. Diese ist nun durch Verwendung eines Enzyms mit der Funktion eines OK1
30 Proteins oder durch die Bereitstellung eines Nucleinsäuremoleküls, das ein OK1 Protein codiert, zur genetischen Modifikation von Pflanzen möglich.

Auch die Phosphatverteilung in von Pflanzen synthetisierter Stärke war aus Mangel an zur Verfügung stehenden Mitteln bisher nicht möglich. Auch eine Veränderung des Phosphatverhältnisses in nativen Stärken ist nun durch die Bereitstellung von Enzymen mit der Funktion von OK1 Proteinen und der Bereitstellung von

5 Nucleinsäuremolekülen, die ein OK1 Protein codieren, durch die vorliegende Erfindung möglich.

Daher umfasst die vorliegende Erfindung auch erfindungsgemäße Pflanzenzellen und erfindungsgemäße Pflanzen, die eine modifizierte Stärke synthetisieren, im

10 Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen.

Der Begriff „modifizierte Stärke“ bedeutet in Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung, dass die Stärke veränderte physiko-chemische Eigenschaften gegenüber

15 nicht modifizierter Stärke, erhältlich aus entsprechenden Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen aufweist.

In einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung synthetisieren erfindungsgemäße Pflanzenzellen oder erfindungsgemäße Pflanzen eine Stärke, die

20 einen erhöhten Gehalt an Stärkephosphat und/oder eine veränderte Phosphatverteilung im Vergleich zu Stärke, isoliert aus entsprechenden Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen aufweist.

Unter dem Begriff „Phosphatverteilung“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden

25 Erfindung der Anteil des in C-2-Position, C-3-Position oder C-6-Position eines Glucosemoleküles gebundenen Stärkephosphates bezogen auf den Gesamtgehalt an Stärkephosphat von Stärke verstanden werden.

In einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung synthetisieren

30 erfindungsgemäße Pflanzenzellen oder erfindungsgemäße Pflanzen eine Stärke, die ein verändertes Verhältnis von C-3-Phosphat zu C-6-Phosphat aufweist im Vergleich zu Stärke aus nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzen. Bevorzugt sind dabei

Stärken, welche einen erhöhten Anteil von in C-3-Position gebundenem Stärkephosphat gegenüber von in C-6-Position gebundenem Stärkephosphat aufweisen im Vergleich zu Stärken aus nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzen.

5

Unter dem Begriff „Verhältnis von C-3-Phosphat zu C-6-Phosphat“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung der Anteil an Stärkephosphat verstanden werden, zu welchem das jeweils in C-3-Position bzw. C-6-Position gebundene Stärkephosphat einer Stärke zu der Summe aus dem in C-3-Position und 10 in C-6-Position gebundenem Stärkephosphat (C-3-Position + C-6-Position) der betreffenden Stärke beiträgt.

Zur Bestimmung der Menge an Stärkephosphat sind verschiedene Methoden beschrieben. Bevorzugt kann die bei Ritte et al. (2000, Starch/Stärke 52, 179-185) 15 beschriebene Methode zur Bestimmung der Menge von Stärkephosphat verwendet werden. Besonders bevorzugt wird die Bestimmung der Menge an Stärkephosphat mittels ^{31}P -NMR nach der bei Kasemusuwan und Jane (1996, Cereal Chemistry 73, 702-707) beschriebenen Methode durchgeführt.

20 Ferner sind Gegenstand der Erfindung genetisch modifizierte Pflanzen, die erfindungsgemäße Pflanzenzellen enthalten. Derartige Pflanzen können durch Regeneration aus erfindungsgemäßen Pflanzenzellen erzeugt werden.

Bei den erfindungsgemäßen Pflanzen kann es sich prinzipiell um Pflanzen jeder 25 beliebigen Pflanzenspezies handeln, d.h. sowohl um monokotyle als auch dikotyle Pflanzen. Bevorzugt handelt es sich um Nutzpflanzen, d.h. Pflanzen, die vom Menschen kultiviert werden für Zwecke der Ernährung oder für technische, insbesondere industrielle Zwecke.

30 In einer weiteren Ausführungsform ist die erfindungsgemäße Pflanze, eine stärkespeichernde Pflanze.

Der Begriff "Stärke speichernde Pflanzen" meint im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung alle Pflanzen mit Pflanzenteilen, die eine Speicherstärke enthalten, wie z.B. Mais, Reis, Weizen, Roggen, Hafer, Gerste, Maniok, Kartoffel, Sago, Mungbohne, Erbse, oder Sorghum.

5

Der Begriff „Kartoffelpflanze“ oder „Kartoffel“ meint im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung Pflanzenspezies der Gattung *Solanum*, besonders Knollen produzierende Spezies der Gattung *Solanum* und insbesondere *Solanum tuberosum*.

10 Der Begriff „Weizenpflanze“ meint im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung Pflanzenspezies der Gattung *Triticum* oder Pflanzen, die aus Kreuzungen mit Pflanzen der Gattung *Triticum* hervorgegangen sind, besonders in der Agrarwirtschaft zu kommerziellen Zwecken angebaute Pflanzenspezies der Gattung *Triticum* bzw. Pflanzen, die aus Kreuzungen mit Pflanzen der Gattung *Triticum* hervorgegangen sind, insbesondere bevorzugt *Triticum aestivum*.

15 Der Begriff „Maispflanze“ meint im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung Pflanzenspezies der Gattung *Zea*, besonders in der Agrarwirtschaft zu kommerziellen Zwecken angebaute Pflanzenspezies der Gattung *Zea*, besonders bevorzugt *Zea mays*.

20 In einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung erfindungsgemäße stärkespeichernde Pflanzen der (systematischen) Familie *Poaceae*. Bevorzugt handelt es sich dabei um Mais- oder Weizenpflanzen.

25

Die vorliegende Erfindung betrifft auch Vermehrungsmaterial erfindungsgemäßer Pflanzen, enthaltend eine erfindungsgemäße Pflanzenzelle.

30 Der Begriff „Vermehrungsmaterial“ umfasst dabei jene Bestandteile der Pflanze, die geeignet sind zur Erzeugung von Nachkommen auf vegetativem oder sexuellem Weg. Für die vegetative Vermehrung eignen sich beispielsweise Stecklinge, Calluskulturen, Rhizome oder Knollen. Anderes Vermehrungsmaterial umfasst

beispielsweise Früchte, Samen, Sämlinge, Protoplasten, Zellkulturen, etc. Vorzugsweise handelt es sich bei dem Vermehrungsmaterial um: Knollen und besonders bevorzugt um endospermhaltige Körner.

- 5 In einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung erntebare Pflanzenteile erfindungsgemäßer Pflanzen, wie Früchte, Speicherwurzeln, Wurzeln, Blüten, Knospen, Sprosse oder Stämme, vorzugsweise Samen, Körner oder Knollen, wobei diese erntebaren Teile erfindungsgemäße Pflanzenzellen enthalten.
- 10 Weiterhin betrifft die vorliegende Erfindung auch ein Verfahren zur Herstellung einer erfindungsgemäßen genetisch modifizierten Pflanze, worin
 - a) eine Pflanzenzelle genetisch modifiziert wird, wobei die genetische Modifikation zur Erhöhung der enzymatischen Aktivität eines OK1 Proteins und eines R1 Proteins im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-15 Pflanzenzellen führt;
 - b) aus Pflanzenzellen von Schritt a) eine Pflanze regeneriert wird;
 - c) und gegebenenfalls weitere Pflanzen mit Hilfe der Pflanzen nach Schritt b) erzeugt werden.
- 20 Für die laut Schritt a) in die Pflanzenzelle eingeführte genetische Modifikation gilt, dass es sich grundsätzlich um jede Art von Modifikation handeln kann, die zur Erhöhung der Aktivität eines OK1 Proteins und eines R1 Proteins führt. Die Regeneration der Pflanzen gemäß Schritt (b) kann nach dem Fachmann bekannten Methoden erfolgen (z.B. beschrieben in „Plant Cell Culture Protocols“, 1999, edt. by 25 R.D. Hall, Humana Press, ISBN 0-89603-549-2).

Die Erzeugung weiterer Pflanzen gemäß Schritt (c) des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Herstellung einer erfindungsgemäßen genetisch modifizierten Pflanze kann z.B. erfolgen durch vegetative Vermehrung (beispielsweise über Stecklinge, 30 Knollen oder über Calluskultur und Regeneration ganzer Pflanzen) oder durch sexuelle Vermehrung. Die sexuelle Vermehrung findet dabei vorzugsweise kontrolliert statt, d.h. es werden ausgewählte Pflanzen mit bestimmten Eigenschaften

miteinander gekreuzt und vermehrt. Die Auswahl erfolgt dabei bevorzugt in der Weise, dass die weiteren Pflanzen, die nach Schritt c) erzeugt werden, die in Schritt a) eingeführte Modifikation aufweisen.

5 Die genetischen Modifikationen zur Erzeugung der erfindungsgemäßen Pflanzenzellen können gleichzeitig oder in aufeinander folgenden Schritten erfolgen. Die genetische Modifikation kann dabei jede genetische Modifikation sein, die zur Erhöhung der Aktivität mindestens eines OK1 Proteins und/oder mindestens eines R1 Proteins führen. Es kann sowohl von Wildtyp-Pflanzen bzw. Wildtyp-
10 Pflanzenzellen ausgegangen werden, in denen noch keine vorherige genetische Modifikation zur Verringerung der Aktivität mindestens eines OK1 Proteins oder mindestens eines R1 Proteins erfolgt ist, oder von bereits genetisch modifizierten Pflanzenzellen bzw. Pflanzen, in denen bereits durch eine genetische Modifikation die Aktivität mindestens eines OK1 Proteins oder mindestens eines R1 Proteins
15 erhöht ist. Es ist unerheblich, ob für die genetische Modifikation, die zu einer erhöhten Aktivität eines OK1 Proteins führt, die gleiche Methode verwendet wird wie für die genetische Modifikation, die zu einer erhöhten Aktivität eines R1 Proteins führt, solange beide genetische Modifikationen zusammen zu einer erhöhten Aktivität eines OK1 Proteins und eines R1 Proteins in derselben Pflanzenzelle führen.

20 In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Herstellung einer erfindungsgemäßen genetisch modifizierten Pflanze besteht die genetische Modifikation in der Einführung mindestens eines fremden Nucleinsäuremoleküls in das Genom der Pflanzenzelle, wobei das Vorhandensein
25 oder die Expression des/der fremden Nucleinsäuremoleküls/Nukleinsäuremoleküle zu einer erhöhten Aktivität eines OK1 Proteins und eines R1 Proteins in der Zelle führt/führen.

30 In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Herstellung einer erfindungsgemäßen genetisch modifizierten Pflanze besteht die genetische Modifikation in der Einführung von mindestens einem fremden Nucleinsäuremolekül in das Genom der Pflanzenzelle, wobei das/die fremde/fremden

Nucleinsäuremolekül/Nukleinsäuremoleküle ein OK1 Protein und/oder ein R1 Protein codierende Sequenzen enthalten.

Wie oben bereits für zur genetischen Modifikation in die Pflanzezelle oder Pflanze
5 eingebrochenen fremden Nukleinsäuremolekülen beschrieben, kann es sich in Schritt
a) des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Herstellung einer erfindungsgemäßen
genetisch modifizierten Pflanze um ein einzelnes Nucleinsäuremolekül oder um
mehrere Nucleinsäuremoleküle handeln. Die oben gemachten Ausführungen sind für
das hier beschriebene erfindungsgemäße Verfahren entsprechend anzuwenden.

10

In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens zur
Herstellung einer erfindungsgemäßen genetisch modifizierten Pflanze besteht die
genetische Modifikation in Schritt a) des Verfahrens in der Einführung eines fremden
Nucleinsäuremoleküls, weches mindestens eine ein R1 Protein codierende Sequenz
15 und mindestens eine ein OK1 Protein codierende Sequenzen enthält.

In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens zur
Herstellung einer erfindungsgemäßen genetisch modifizierten Pflanze besteht die
genetische Modifikation in Schritt a) des Verfahrens in der Einführung mehrerer
20 fremder Nucleinsäuremoleküle, wobei mindestens ein erstes Nucleinsäuremolekül
eine ein R1 Protein codierende Sequenz enthält und mindestens ein zweites
Nucleinsäuremolekül eine ein OK1 Protein codierende Sequenzen enthält.

Weiterhin können zur Einführung eines fremden Nukleinsäuremoleküls bei der
25 Durchführung erfindungsgemäßer Verfahren anstelle einer Wildtyp-Pflanzenzelle
bzw. Wildtyp-Pflanze, eine Mutantenzelle bzw. eine Mutante, die sich dadurch
auszeichnet, dass sie bereits eine erhöhte Aktivität eines OK1 Proteins oder eine
erhöhte Aktivität eines R1 Proteins aufweiset, verwendet werden. Die weiter oben
30 gemachten Angaben zur Verwendung von Mutanten für die Herstellung
erfindungsgemäßer Pflanzenzellen oder Pflanzen, sind hier entsprechend
anzuwenden.

In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Herstellung einer erfindungsgemäßen genetisch modifizierten Pflanze, ist mindestens ein fremdes Nucleinsäuremolekül ausgewählt, aus der Gruppe bestehend aus

- 5 a) Nucleinsäuremolekülen, die ein Protein mit der unter SEQ ID NO 2 oder SEQ ID NO 4 angegebenen Aminosäuresequenz codieren;
- b) Nucleinsäuremolekülen, die ein Protein codieren, das die Aminosäuresequenz umfasst, die von der Insertion in Plasmid A.t.-OK1-pGEM oder der Insertion in Plasmid pMI50 codiert wird;
- 10 c) Nucleinsäuremolekülen, die ein Protein codieren, dessen Aminosäuresequenz eine Identität von mindestens 60% zu der unter SEQ ID NO 2 oder SEQ ID NO 4 angegebenen Aminosäuresequenz aufweisen;
- d) Nucleinsäuremolekülen, die ein Protein codieren, dessen Sequenz eine Identität von mindestens 60% zu der Aminosäuresequenz aufweist; die von der 15 Insertion in Plasmid A.t.-OK1-pGEM oder von der Insertion in Plasmid pMI50 codiert wird;
- e) Nucleinsäuremolekülen, die die unter SEQ ID NO 1 oder SEQ ID NO 3 dargestellte Nucleotidsequenz oder eine komplementäre Sequenz umfassen;
- f) Nucleinsäuremolekülen, die die Nucleotidsequenz der im Plasmid A.t.-OK1- 20 pGEM oder Plasmid pMI50 enthaltenen Insertion umfassen;
- g) Nucleinsäuremolekülen, welche zu den unter a), b), e) oder f) beschriebenen Nucleinsäuresequenzen eine Identität von mindestens 70% aufweisen;
- h) Nucleinsäuremolekülen, welche mit mindestens einem Strang der unter a), b), 25 e) oder f) beschriebenen Nucleinsäuremolekülen unter stringenten Bedingungen hybridisieren;
- i) Nucleinsäuremolekülen, deren Nucleotidsequenz aufgrund der Degeneration des genetischen Codes von der Sequenz der unter a), b), e) oder f) genannten Nucleinsäuremoleküle abweicht; und
- j) Nucleinsäuremolekülen, die Fragmente, allelische Varianten und/oder Derivate 30 der unter a), b), c), d), e), f), g), h) oder i) genannten Nucleinsäuremoleküle darstellen.

In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Herstellung einer erfindungsgemäßen genetisch modifizierten Pflanze, codiert mindestens ein fremdes Nucleinsäuremolekül ein R1 Protein aus Kartoffel, Weizen, Reis, Mais, Soyabohne, Citrus oder *Arabidopsis*. Referenzen für die genannten

5 Nucleinsäuresequenzen codierend R1 Proteine aus den genannten Pflanzen sind bereits weiter oben angegeben.

Eine weitere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung einer erfindungsgemäßen genetisch modifizierten Pflanze, worin

10 a) eine Pflanzenzelle genetisch modifiziert wird, wobei die genetische Modifikation zur Erhöhung der enzymatischen Aktivität eines OK1 Proteins im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen führt;

b) aus Pflanzenzellen von Schritt a) eine Pflanze regeneriert wird;

c) gegebenenfalls weitere Pflanzen mit Hilfe der Pflanzen nach Schritt b) erzeugt

15 werden und

d) Pflanzen erhalten nach Schritt b) oder c) mit einer Pflanze gekreuzt werden, die eine Erhöhung der enzymatischen Aktivität eines R1 Proteins aufweist, im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen.

20

Eine weitere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung einer erfindungsgemäßen genetisch modifizierten Pflanze, worin

a) eine Pflanzenzelle genetisch modifiziert wird, wobei die genetische Modifikation zur Erhöhung der enzymatischen Aktivität eines R1 Proteins im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen führt;

b) aus Pflanzenzellen von Schritt a) eine Pflanze regeneriert wird;

c) gegebenenfalls weitere Pflanzen mit Hilfe der Pflanzen nach Schritt b) erzeugt werden und

d) Pflanzen erhalten nach Schritt b) oder c) mit einer Pflanze gekreuzt werden, die eine Erhöhung der enzymatischen Aktivität eines OK1 Proteins aufweist, im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen.

Dabei können die Pflanzen nach Schritt a) wie bereits oben beschrieben, genetisch modifiziert werden. Die Regeneration von Pflanzen nach Schritt b) und die Erzeugung weiterer Pflanzen nach Schritt c) wurden ebenfalls bereits oben

5 dargestellt.

Eine Pflanze, die nach Schritt d) der beiden letztgenannten Ausführungsformen mit

Pflanzen oder Nachkommen der Pflanzen, erhalten aus Schritt b) oder c), gekreuzt wird, kann jede Pflanze sein, die eine erhöhte Aktivität eines OK1 Proteins bzw. eines R1 Proteins aufweist, im Vergleich zu entsprechenden Wildtyp-Pflanzen. Die

10 Erhöhung der Aktivität eines OK1 Proteins bzw. eines R1 Proteins kann dabei durch jede Modifikation hervorgerufen sein, die zu einer Erhöhung der Aktivität der betreffenden Proteine in den entsprechenden Pflanzen führt. Es kann sich bei diesen Pflanzen um Mutanten oder mittels gentechnischer Methoden modifizierte Pflanzen handeln. Bei den Mutanten kann es sich sowohl um spontan (natürlich) auftretende

15 Mutanten, als auch um solche handeln, die durch den gezielten Einsatz von Mutagenen (wie z.B. chemische Agentien, ionisierende Strahlung) oder gentechnischen Verfahren (z.B. Transposon activation tagging, T-DNA activation tagging, *in vivo*-Mutagenese) erzeugt wurden. Bevorzugt handelt es sich bei den durch gentechnische Verfahren erzeugten Pflanzen um mittels Insertionsmutagenese

20 hergestellte Mutanten, besonders bevorzugt um genetisch modifizierte Pflanzen, die ein fremdes Nucleinsäuremolekül exprimieren, insbesondere bevorzugt um genetisch modifizierte Pflanzen, bei welchen das fremde Nucleinsäuremolekül ein OK1 Protein bzw. ein R1 Protein codiert.

25 In einer weiteren Ausführungsform wird das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung einer erfindungsgemäßen genetisch modifizierten Pflanze zur Erzeugung von Stärke speichernden Pflanzen verwendet.

30 In einer weiteren Ausführungsform wird das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung einer erfindungsgemäßen genetisch modifizierten Pflanze zur Erzeugung erfindungsgemäßer Mais- oder Weizenpflanzen verwendet.

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung ein erfindungsgemäßes Verfahren zur Herstellung einer erfindungsgemäßgenetisch modifizierten Pflanze, worin die genetisch modifizierte Pflanze eine modifizierte Stärke synthetisiert im Vergleich zu Stärke aus nicht genetisch modifizierten Wildtyp-

5 Pflanzen.

In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßigen Verfahrens zur Herstellung einer erfindungsgemäßgenetisch modifizierten Pflanze synthetisieren die erfindungsgemäßgenetisch modifizierten Pflanzen eine modifizierte Stärke, die einen erhöhten Gehalt 10 an Stärkephosphat und/oder eine veränderte Phosphatverteilung im Vergleich zu Stärke, isoliert aus entsprechenden Wildtyp-Pflanzen aufweist.

In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßigen Verfahrens zur Herstellung einer erfindungsgemäßgenetisch modifizierten Pflanze synthetisieren 15 die erfindungsgemäßgenetisch modifizierten Pflanzen eine modifizierte Stärke, die ein verändertes Verhältnis von C-3-Phosphat zu C-6-Phosphat aufweist im Vergleich zu Stärke aus nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzen. Insbesondere bevorzugt sind dabei Stärken, welche einen erhöhten Anteil von in C-3-Position gebundenem 20 Stärkephosphat gegenüber von in C-6-Position gebundenem Stärkephosphat aufweisen im Vergleich zu Stärke aus nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzen.

Die vorliegende Erfindung betrifft auch die durch erfindungsgemäßes Verfahren erhältlichen Pflanzen.

25 Es wurde überraschenderweise gefunden, dass Stärke, isoliert aus erfindungsgemäßgenetisch modifizierten Pflanzenzellen und erfindungsgemäßgenetisch modifizierten Pflanzen, die eine erhöhte Aktivität eines OK1 Proteins und eine erhöhte Aktivität eines R1 Proteins aufweisen, eine modifizierte Stärke synthetisieren.

Insbesondere die erhöhten Mengen an Stärkephosphat erfindungsgemäßiger Stärken 30 verleihen den Stärken überraschende und vorteilhafte Eigenschaften. Erfindungsgemäßige Stärken tragen durch den erhöhten Anteil an Stärkephosphat einen erhöhten Anteil an geladenen Gruppen, die die funktionellen Eigenschaften der

Stärke wesentlich beeinflussen. Stärke, die geladene funktionelle Gruppen trägt, ist insbesondere in der Papierindustrie einsetzbar, wo sie für die Oberflächenbeschichtung (Coating) von Papier verwendet werden. Papier, welches mit geladenen Molekülen, die außerdem gute Klebeeigenschaften aufweisen, 5 beschichtet ist, eignet sich besonders für die Aufnahme von Farbstoffen, wie z.B. Tinte, Druckfarben etc..

Die vorliegende Erfindung betrifft auch modifizierte Stärken, erhältlich aus erfindungsgemäßen Pflanzenzellen oder erfindungsgemäßen Pflanzen, aus 10 erfindungsgemäßem Vermehrungsmaterial oder aus erfindungsgemäßen erntebaren Pflanzenteilen.

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung erfindungsgemäß modifizierte Stärke aus stärkespeichernden Pflanzen, bevorzugt 15 aus Stärke speichernden Pflanzen der (systematischen) Familie *Poaceae*, besonders bevorzugt aus Mais- oder Weizenpflanzen.

Die vorliegende Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Herstellung einer modifizierten Stärke, umfassend den Schritt der Extraktion der Stärke aus einer 20 erfindungsgemäßen Pflanzenzelle oder einer erfindungsgemäßen Pflanze, aus erfindungsgemäßem Vermehrungsmaterial einer solchen Pflanze und/oder aus erfindungsgemäßen erntebaren Pflanzenteilen einer solchen Pflanze, vorzugsweise aus erfindungsgemäßen Stärke speichernden Teilen einer solchen Pflanze. Vorzugsweise umfasst ein solches Verfahren auch den Schritt des Erntens der 25 kultivierten Pflanzen bzw. Pflanzenteile und/oder des Vermehrungsmaterials dieser Pflanzen vor der Extraktion der Stärke und besonders bevorzugt ferner den Schritt der Kultivierung erfindungsgemäßer Pflanzen vor dem Ernten.

Verfahren zur Extraktion der Stärke aus Pflanzen oder von Stärke speichernden 30 Teilen von Pflanzen sind dem Fachmann bekannt. Weiterhin sind Verfahren zur Extraktion der Stärke aus verschiedenen Stärke speichernde Pflanzen beschrieben, z. B. in Starch: Chemistry and Technology (Hrsg.: Whistler, BeMiller und Paschall

(1994), 2. Ausgabe, Academic Press Inc. London Ltd; ISBN 0-12-746270-8; siehe z.B. Kapitel XII, Seite 412-468: Mais und Sorghum Stärken: Herstellung; von Watson; Kapitel XIII, Seite 469-479: Tapioca, Arrowroot und Sago Stärken: Herstellung; von Corbishley und Miller; Kapitel XIV, Seite 479-490: Kartoffelstärke: Herstellung und

5 Verwendungen; von Mitch; Kapitel XV, Seite 491 bis 506: Weizenstärke: Herstellung, Modifizierung und Verwendungen; von Knight und Oson; und Kapitel XVI, Seite 507 bis 528: Reisstärke: Herstellung und Verwendungen; von Rohmer und Klem; Maisstärke: Eckhoff et al., Cereal Chem. 73 (1996), 54-57, die Extraktion von Maisstärke im industriellen Maßstab wird in der Regel durch das so genannte "wet 10 milling" erreicht.). Vorrichtungen, die für gewöhnlich bei Verfahren zur Extraktion von Stärke von Pflanzenmaterial verwendet werden, sind Separatoren, Dekanter, Hydrocyclone, Sprühtrockner und Wirbelschichttrockner.

Unter dem Begriff „Stärke speichernde Teile“ sollen im Zusammenhang mit der 15 vorliegenden Erfindung solche Teile einer Pflanze verstanden werden, in welchen Stärke, im Gegensatz zu transitorischer Blattstärke, zur Überdauerung von längeren Zeiträumen als Depot gespeichert wird. Bevorzugte Stärke speichernde Pflanzenteile sind z.B. Knollen, Speicherwurzeln und Körner, besonders bevorzugt sind Körner enthaltend ein Endosperm, insbesondere bevorzugt sind Körner enthaltend ein 20 Endosperm von Mais- oder Weizenpflanzen.

Modifizierte Stärke, erhältlich nach einem erfindungsgemäßen Verfahren zur Herstellung modifizierter Stärke, ist ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

25

In einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung handelt es sich bei den erfindungsgemäßen modifizierten Stärken um native Stärken.

Der Begriff „native Stärke“ bedeutet im Zusammenhang mit der vorliegenden 30 Erfindung, dass die Stärke nach dem Fachmann bekannten Methoden aus erfindungsgemäßen Pflanzen, erfindungsgemäßem erntebaren Pflanzenteilen,

erfindungsgemäßen Stärke speichernden Teilen oder erfindungsgemäßem Vermehrungsmaterial von Pflanzen isoliert wird.

Weiterhin ist die Verwendung erfindungsgemäßer Pflanzenzellen oder 5 erfindungsgemäßer Pflanzen zur Herstellung einer modifizierten Stärke Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

Dem Fachmann ist bekannt, dass die Eigenschaften von Stärke durch z.B. 10 thermische, chemische, enzymatische oder mechanische Derivatisierung verändert werden können. Derivatisierte Stärken sind für verschiedene Anwendungen im Nahrungsmittel- und/oder Nicht-Nahrungsmittelbereich besonders geeignet. Die erfindungsgemäßen Stärken sind als Ausgangssubstanz besser geeignet zur Herstellung von derivatisierten Stärken als herkömmliche Stärken, da sie durch den höheren Gehalt an Stärkephosphat einen höheren Anteil an reaktiven funktionalen 15 Gruppen aufweisen.

Die vorliegende Erfindung betrifft daher auch Verfahren zur Herstellung einer derivatisierten Stärke, worin erfindungsgemäße modifizierte Stärke, nachträglich derivatisiert wird.

Unter dem Begriff „derivatierte Stärke“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung eine erfindungsgemäße modifizierte Stärke verstanden werden, deren Eigenschaften nach der Isolierung aus pflanzlichen Zellen mit Hilfe von chemischen, enzymatischen, thermischen oder mechanischen Verfahren verändert wurde.

In einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung handelt es sich bei 25 der erfindungsgemäßen derivatisierten Stärke um mit Hitze und/oder mit Säure behandelte Stärke.

30 In einer weiteren Ausführungsform handelt es sich bei den derivatisierten Stärken um Stärkeether, insbesondere um Stärke-Alkylether, O-Allylether, Hydroxylalkylether, O-

Carboxymethylether, stickstoffhaltige Stärkeether, phosphathaltige Stärkeether oder schwefelhaltige Stärkeether.

In einer weiteren Ausführungsform handelt es sich bei den derivatisierten Stärken um

5 vernetzte Stärken.

In einer weiteren Ausführungsform handelt es sich bei den derivatisierten Stärken um Stärke-Ppropf-Polymerisate.

10 In einer weiteren Ausführungsform handelt es sich bei den derivatisierten Stärken um oxidierte Stärken.

In einer weiteren Ausführungsform handelt es sich bei den derivatisierten Stärken um Stärkeester, insbesondere um Stärkeester, die unter Verwendung von organischen

15 Säuren in die Stärke eingeführt wurden. Besonders bevorzugt handelt es sich um Phosphat-, Nitrat-, Sulfat-, Xanthat-, Acetat- oder Citratstärken.

Die erfindungsgemäßen derivatisierten Stärken eignen sich für verschiedene Verwendungen in der Pharmaindustrie, im Nahrungsmittel- und/oder Nicht-

20 Nahrungsmittelbereich. Methoden zur Herstellung von erfindungsgemäßen derivatisierten Stärken sind dem Fachmann bekannt und in der allgemeinen Literatur ausreichend beschrieben. Eine Übersicht zur Herstellung von derivatisierten Stärken findet sich z.B. bei Orthoefer (in Corn, Chemistry and Technology, 1987, eds. Watson und Ramstad, Chapter 16, 479-499).

25

Derivatierte Stärke, erhältlich nach dem erfindungsgemäßen Verfahren zur Herstellung einer derivatisierten Stärke ist ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

30 Ferner ist die Verwendung erfindungsgemäßer modifizierter Stärken zur Herstellung von derivatisierter Stärke Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

Stärke speichernde Teile von Pflanzen werden oft zu Mehlen verarbeitet. Beispiele für Teile von Pflanzen, aus welchen Mehle hergestellt werden, sind z.B. Knollen von Kartoffelpflanzen und Körner von Getreidepflanzen. Zur Herstellung von Mehlen aus Getreidepflanzen werden die endospermhaltigen Körner dieser Pflanzen gemahlen und gesiebt. Stärke ist ein Hauptbestandteil des Endosperms. Bei anderen Pflanzen, die kein Endosperm, sondern andere Stärke speichernde Teile, wie z.B. Knollen oder Wurzeln enthalten, wird Mehl häufig durch Zerkleinern, Trocknen und anschließendem Mahlen der betreffenden Speicherorgane hergestellt. Die Stärke des Endosperms oder enthaltend in Stärke speichernden Teilen von Pflanzen ist ein wesentlicher Anteil des Mehls, welches aus den betreffenden Pflanzenteilen hergestellt wird. Die Eigenschaften von Mehlen werden daher auch durch die in dem betreffenden Mehl vorliegende Stärke beeinflusst. Erfindungsgemäße Pflanzenzellen und erfindungsgemäße Pflanzen synthetisieren eine veränderte Stärke im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzen. Mehle, hergestellt aus erfindungsgemäßen Pflanzenzellen, erfindungsgemäßen Pflanzen, erfindungsgemäßem Vermehrungsmaterial oder erfindungsgemäßen erntebaren Teilen weisen daher veränderte Eigenschaften auf. Die Eigenschaften von Mehlen können auch durch Mischen von Stärke mit Mehlen oder durch das Mischen von Mehlen mit unterschiedlichen Eigenschaften beeinflusst werden.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft daher Mehle, enthaltend eine erfindungsgemäße Stärke.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft Mehle, die aus erfindungsgemäßen Pflanzenzellen, erfindungsgemäßen Pflanzen, Stärke speichernden Teilen erfindungsgemäßer Pflanzen, aus erfindungsgemäßem Vermehrungsmaterial oder aus erfindungsgemäßen erntebaren Pflanzenteilen hergestellt sind. Bevorzugte Stärke speichernde Teile erfindungsgemäßer Pflanzen sind Knollen, Speicherwurzeln und ein Endosperm enthaltende Körner. Vorzugsweise stammen Knollen von Kartoffelpflanzen und Körner von Pflanzen der

(systematischen) Familie *Poaceae*, besonders bevorzugt stammen Körner von Mais- oder Weizenpflanzen.

Unter dem Begriff „Mehl“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung ein

5 durch Mahlen von Pflanzenteilen erhaltenes Pulver verstanden werden. Gegebenenfalls werden Pflanzenteile vor dem Mahlen getrocknet und nach dem Mahlen zerkleinert und/oder gesiebt.

Erfindungsgemäße Mehle zeichnen sich auf Grund der in ihnen vorliegenden Stärke,

10 die einen veränderten Phosphatgehalt und/oder eine veränderte Phosphatverteilung aufweisen insbesondere durch ihr erhöhtes Wasserbindevermögen aus. Diese ist z.B. bei der Verarbeitung von Mehlen in der Lebensmittelindustrie für viele Anwendungen, insbesondere bei der Herstellung von Backwaren gewünscht.

15 Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Verfahren zur Herstellung von Mehlen, umfassend den Schritt des Mahlens von erfindungsgemäßen Pflanzenzellen, erfindungsgemäßen Pflanzen, von Teilen erfindungsgemäßer Pflanzen, Stärke speichernden Teilen von erfindungsgemäßen Pflanzen, erfindungsgemäßem Vermehrungsmaterial oder erfindungsgemäßem

20 erntbarem Material.

Mehle können durch Mahlen von Stärke speichernden Teilen von erfindungsgemäßen hergestellt werden. Dem Fachmann ist bekannt, wie er Mehle herstellt. Vorzugsweise umfasst ein Verfahren zur Herstellung von Mehlen auch den

25 Schritt des Erntens der kultivierten Pflanzen bzw. Pflanzenteile und/oder des Vermehrungsmaterials bzw. der Stärke speichernden Teile dieser Pflanzen vor dem Mahlen und besonders bevorzugt ferner den Schritt der Kultivierung erfindungsgemäßer Pflanzen vor dem Ernten.

30 Unter dem Begriff „Teile von Pflanzen“ sollen im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung alle Teile einer Pflanze verstanden werden, die als Bestandteile in ihrer Gesamtheit eine vollständige Pflanze darstellen. Teile von

Pflanzen sind z.B. Sprosse, Blätter, Rhizome, Wurzeln, Rüben, Knollen, Schoten, Samen oder Körner.

In einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung umfasst das

5 Verfahren zur Herstellung von Mehlen eine Prozessierung von erfindungsgemäßigen Pflanzen, von Stärke speichernden Teilen erfindungsgemäßer Pflanzen, von erfindungsgemäßem Vermehrungsmaterial oder von erfindungsgemäßem erntebarem Material vor dem Mahlen.

Die Prozessierung kann dabei z.B. eine Hitzebehandlung und/oder eine Trocknung

10 sein. Hitzebehandlung gefolgt von einer Trocknung des Hitze behandelten Materials wird z.B. bei der Herstellung von Mehlen aus Speicherwurzeln oder Knollen wie z.B. aus Kartoffelknollen angewendet, bevor die das Mahlen erfolgt. Die Zerkleinerung von erfindungsgemäßigen Pflanzen, von Stärke speichernden Teilen erfindungsgemäßer Pflanzen, von erfindungsgemäßem Vermehrungsmaterial oder

15 von erfindungsgemäßem erntebarem Material vor dem Mahlen kann ebenfalls eine Prozessierung im Sinne der vorliegenden Erfindung darstellen. Die Entfernung von pflanzlichem Gewebe, wie z.B. von Spelzen der Körner, vor dem Mahlen stellt auch eine Prozessierung vor dem Mahlen in Sinne der vorliegenden Erfindung dar.

20 In einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung umfasst das Verfahren zur Herstellung von Mehlen nach dem Mahlen eine Prozessierung des Mahlgutes.

Das Mahlgut kann dabei z.B. nach dem Mahlen gesiebt werden, um z.B. verschiedene Typenmehle herzustellen.

25 Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung von erfindungsgemäßigen genetisch modifizierten Pflanzenzellen, erfindungsgemäßigen Pflanzen, von Teilen erfindungsgemäßer Pflanzen, Stärke speichernden Teilen von erfindungsgemäßigen Pflanzen, erfindungsgemäßem Vermehrungsmaterial oder

30 erfindungsgemäßem erntebarem Material zur Herstellung von Mehlen.

Es ist auch Aufgabe der vorliegenden Erfindung, Mittel, wie z.B. DNA Moleküle zur Erzeugung von erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und erfindungsgemäßen Pflanzen, die im Vergleich zu nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen eine modifizierte Stärke synthetisieren, zur Verfügung zu 5 stellen. Die zur Verfügung gestellten DNA Moleküle beinhalten Nucleinsäuresequenzen, welche ein OK1 Protein codieren. Ein Protein mit der enzymatischen Aktivität eines OK1 Proteins war dem Fachmann bisher nicht bekannt. Daher konnten auch keine DNA Moleküle zur Verfügung gestellt werden, die es erlauben, erfindungsgemäße Pflanzenzellen und erfindungsgemäße Pflanzen 10 und die von ihnen synthetisierte Stärke bzw. die aus ihnen gewonnenen Mehle zu erzeugen.

Somit betrifft die vorliegende Erfindung auch ein rekombinantes Nukleinsäuremolekül 15 enthaltend eine Nucleinsäuresequenz codierend ein OK1 Protein und eine Nucleinsäuresequenz codierend ein R1 Protein.

Unter dem Begriff „rekombinantes Nukleinsäuremolekül“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung ein Nukleinsäuremolekül verstanden werden, welches sowohl Nucleinsäuresequenzen codierend ein OK1 Protein, als auch 20 Nucleinsäuresequenzen codierend ein R1 Protein, enthält und bei welchem die Nucleinsäuresequenzen codierend ei OK1 Protein und ein R1 Protein in einer Anordnung vorliegen, wie sie natürlicherweise im Genom eines Organismus nicht vorliegen. Neben Nucleinsäuresequenzen codierend ein OK1 Protein und Nucleinsäuresequenzen codierend ein R1 Protein kann das rekombinante 25 Nucleinsäuremolekül noch zusätzliche Sequenzen enthalten, welche natürlicherweise nicht in einer solchen Anordnung vorliegen, wie sie in erfindungsgemäßen rekombinanten Nucleinsäuremolekülen vorliegen. Die genannten zusätzlichen Sequenzen können dabei beliebige Sequenzen sein, bevorzugt handelt es sich dabei um regulatorische Sequenzen (Promotoren, 30 Terminationssignale, Enhancer), besonders bevorzugt um regulatorische Sequenzen, die in pflanzlichem Gewebe aktiv sind, besonders bevorzugt um regulatorische Sequenzen die in Stärke speicherndem pflanzlichem Gewebe aktiv

sind. Methoden zur Erzeugung erfindungsgemäßer rekombinanter Nucleinsäuremoleküle sind dem Fachmann bekannt und umfassen gentechnische Methoden wie z.B. die Verbindung von Nucleinsäuremolekülen durch Ligation, genetische Rekombination oder die Neusynthese von Nucleinsäuremolekülen (siehe

5 z.B. Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3rd edition (2001) Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY. ISBN: 0879695773; Ausubel et al., Short Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons; 5th edition (2002), ISBN: 0471250929).

10 Eine weitere Ausführungsform von erfindungsgemäßen rekombinanten Nucleinsäuremolekülen der vorliegenden Erfindung betreffen Vektoren, insbesondere Plasmide, Cosmide, Viren, Bacteriophagen und andere in der Gentechnik gängige Vektoren, die die oben beschriebenen erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle enthalten.

15 15 In einer weiteren Ausführungsform sind die in den Vektoren enthaltenen erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle verknüpft mit regulatorischen Sequenzen, die die Expression in prokaryontischen oder eukaryontischen Zellen initiieren. Der Begriff "Expression" kann dabei Transkription als auch Transkription und Translation 20 bedeuten. Die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle können dabei zu den regulatorischen Sequenzen in „sense“-Orientierung, und/oder in „antisense“-Orientierung vorliegen. Die erfindungsgemäßen rekombinanten Nucleinsäuremoleküle können dabei gemeinsam unter der Kontrolle eines einzigen regulatorischen Elementes stehen, oder sie können jeweils ein eigenes 25 regulatorisches Element aufweisen.

Regulatorische Sequenzen zur Expression in prokaryontischen Organismen, z.B. *E. coli*, und in eukaryontischen Organismen sind ausreichend in der Literatur beschrieben, insbesondere solche zur Expression in Hefe, wie z. B. *Saccharomyces cerevisiae*. Eine Übersicht verschiedener Systeme zur Expression für Proteine in verschiedenen Wirtsorganismen findet man z. B. in Methods in Enzymology 153 (1987), 383-516 und in Bitter et al. (Methods in Enzymology 153 (1987), 516-544).

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Wirtszelle, insbesondere eine prokaryontische oder eukaryontische Zelle, die genetisch modifiziert ist mit einem erfindungsgemäßen rekombinanten Nucleinsäuremolekül

5 und/oder mit einem erfindungsgemäßen Vektor, sowie Zellen, die von derartigen Wirtszellen abstammen und die die erfindungsgemäße genetische Modifikation enthalten.

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung Wirtszellen, insbesondere

10 prokaryontische oder eukaryontische Zellen, die mit einem erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekül oder einem erfindungsgemäßen Vektor transformiert wurden, sowie Wirtszellen, die von derartigen Wirtszellen abstammen und die beschriebenen erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle oder Vektoren enthalten.

15 Die Wirtszellen können Bakterien- (z.B. *E. coli*, Bakterien der Gattung *Agrobacterium* insbesondere *Agrobacterium tumefaciens* oder *Agrobacterium rhizogenes*) oder Pilzzellen (z.B. Hefe, insbesondere *S. cerevisiae*, *Agaricus*, insbesondere *Agaricus bisporus*, *Aspergillus*, *Trichoderma*), sowie pflanzliche oder tierische Zellen sein. Der Begriff "transformiert" bedeutet dabei, dass die erfindungsgemäßen Zellen mit einem

20 erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekül genetisch modifiziert sind insofern, als sie zusätzlich zu ihrem natürlichen Genom mindestens ein erfindungsgemäßes Nucleinsäuremolekül enthalten. Dieses kann in der Zelle frei, gegebenenfalls als selbstreplizierendes Molekül, vorliegen oder es kann stabil in das Genom der Wirtszelle integriert vorliegen.

25 Vorzugsweise sind die Wirtszellen Mikroorganismen. Darunter werden im Rahmen der vorliegenden Anmeldung alle Bakterien und alle Protisten (z. B. Pilze, insbesondere Hefen und Algen) verstanden, so wie sie z. B. in Schlegel "Allgemeine Mikrobiologie" (Georg Thieme Verlag (1985), 1-2) definiert sind.

30 Bevorzugt sind die erfindungsgemäßen Wirtszellen Pflanzenzellen. Dabei kann es sich prinzipiell um Pflanzenzellen aus jeder beliebigen Pflanzenspezies handeln, d.h. sowohl monokotyle als auch dikotyle Pflanzen. Bevorzugt handelt es sich um

Pflanzenzellen aus landwirtschaftlichen Nutzpflanzen, d.h. aus Pflanzen, die vom Menschen kultiviert werden für Zwecke der Ernährung oder für technische, insbesondere industrielle Zwecke. Vorzugsweise betrifft die Erfindung Pflanzenzellen und Pflanzen aus Stärke speichernden Pflanzen (Mais, Reis, Weizen, Roggen,

5 Hafer, Gerste, Maniok, Kartoffel, Sago, Mungbohne, Erbse oder Sorghum), bevorzugt Pflanzenzellen aus Pflanzen der (systematischen) Familie *Poaceae*, insbesondere bevorzugt sind Pflanzenzellen aus Mais- oder Weizenpflanzen.

10 Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind auch Zusammensetzungen enthaltend ein erfindungsgemäßes rekombinantes Nucleinsäuremolekül, oder einen erfindungsgemäßem Vektor. Bevorzugt sind erfindungsgemäßige Zusammensetzungen, enthaltend ein erfindungsgemäßes rekombinantes Nucleinsäuremolekül oder einen erfindungsgemäßem Vektor und eine Wirtszelle.

15 Besonders bevorzugt handelt es sich bei der Wirtszelle um eine Pflanzenzelle, insbesondere bevorzugt um eine Zelle einer Mais- oder Weizenpflanze.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft eine Zusammensetzung, enthaltend eine Nucleinsäuresequenz codierend ein OK1 Protein und eine

20 Nucleinsäuresequenz codierend ein R1 Protein.

Die Nucleinsäuresequenzen codierend ein OK1 Protein bzw. codierend ein R1 Protein können dabei zusammen auf einem einzigen Nucleinsäuremolekül, oder auf voneinander getrennten Nucleinsäuremolekülen vorliegen.

25 Ein weiterer Aspekt erfindungsgemäßer Zusammensetzungen betrifft Zusammensetzungen, die zur Erzeugung von erfindungsgemäßigen Wirtszellen, bevorzugt zur Erzeugung erfindungsgemäßer Pflanzenzellen verwendet werden können. Bevorzugt handelt es sich hierbei um eine Zusammensetzung, enthaltend Nucleinsäuresequenzen codierend ein OK1 Protein und Nucleinsäuresequenzen

30 codierend ein R1 Protein, ein erfindungsgemäßes rekombinantes Nucleinsäuremolekül oder einen erfindungsgemäßem Vektor und einen biolistischen Träger, welcher zur Einführung von Nucleinsäuremolekülen in eine Wirtszelle

geeignet ist. Bevorzugte biolistische Träger sind Partikel aus Wolfram, Gold oder Kunststoffen.

Eine weitere Ausführungsform erfindungsgemäßer Zusammensetzungen betrifft

- 5 Zusammensetzungen enthaltend Nucleinsäuresequenzen codierend ein OK1 Protein und Nucleinsäuresequenzen codierend ein R1 Protein, ein erfindungsgemäßes rekombinantes Nucleinsäuremolekül oder einen erfindungsgemäßen Vektor und eine Pflanzenzelle und ein synthetisches Kulturmedium. Bevorzugt enthalten solche Zusammensetzungen zusätzlich zu Pflanzenzellen und synthetischem Kulturmedium
- 10 auch Polyethylenglykol (PEG). Bei diesen Zusammensetzungen liegt das erfindungsgemäße rekombinante Nucleinsäuremolekül außerhalb der Pflanzenzelle vor, d.h. es befindet sich außerhalb des von einer Cytoplasmamembran umschlossenen Zellinneren der Pflanzenzelle.

Synthetische Kulturmedien, die zur Kultivierung und/oder zur Transformation von

- 15 Pflanzenzellen geeignet sind, sind dem Fachmann bekannt und z.B. ausreichend in der Literatur beschrieben. Viele unterschiedliche synthetische Kulturmedien sind auch im Fachhandel käuflich erwerbbar (z.B. DUCHEFA Biochemie B.V., Belgien).

Weiterhin betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung erfindungsgemäßer

- 20 Zusammensetzungen zur Transformation von Pflanzenzellen.

Beschreibung der Sequenzen

SEQ ID NO 1: Nucleinsäuresequenz enthaltend die codierende Region eines A.t.-OK1 Proteins aus *Arabidopsis thaliana*. Diese Sequenz ist den Vektoren OK1-pGEM-T und OK1-pDEST™17 und inseriert.

5 SEQ ID NO 2: Aminosäuresequenz codierend ein A.t.-OK1 Protein aus *Arabidopsis thaliana*. Diese Sequenz ist von der unter SEQ ID NO 1 dargestellten Nucleinsäuresequenz ableitbar.

10 SEQ ID NO 3: Nucleinsäuresequenz enthaltend die codierende Region eines O.s.-OK1 Proteins aus *Oryza sativa*. Diese Sequenz ist dem Vektor pMI50 inseriert.

15 SEQ ID NO 4: Aminosäuresequenz codierend ein O.s.-OK1 Protein aus *Oryza sativa*. Diese Sequenz ist von der unter SEQ ID NO 3 dargestellten Nucleinsäuresequenz ableitbar.

SEQ ID NO 5: Peptidsequenz codierend die Phosphohistidindomäne der OK1 Proteine aus *Arabidopsis thaliana*, und *Oryza sativa*.

20 SEQ ID NO 6: Nucleinsäuresequenz enthaltend die codierende Region eines C.r.-R1 Proteins aus *Citrus reticulata*.

SEQ ID NO 7: Aminosäuresequenz codierend ein C.r.-R1 Protein aus *Citrus reticulata*.

25 SEQ ID NO 8: Nucleinsäuresequenz enthaltend die codierende Region eines A.t.-R1 Proteins aus *Arabidopsis thaliana*.

SEQ ID NO 9: Aminosäuresequenz codierend ein A.t.-R1 Protein aus *Arabidopsis thaliana*.

SEQ ID NO 10: Nucleinsäuresequenz enthaltend die codierende Region eines S.t.-R1 Proteins aus *Solanum tuberosum*.

30 SEQ ID NO 11: Aminosäuresequenz codierend ein S.t.-R1 Protein aus *Solanum tuberosum*.

SEQ ID NO 12: Nucleinsäuresequenz enthaltend die codierende Region eines O.s.-R1 Proteins aus *Oryza sativa*.

SEQ ID NO 13: Aminosäuresequenz codierend ein O.s.-R1 Protein aus *Oryza sativa*

SEQ ID NO 14: Nucleinsäuresequenz enthaltend die codierende Region eines G.m.-R1 Proteins aus *Glycine max*.

SEQ ID NO 15: Aminosäuresequenz codierend das S.t.-R1 Protein aus *Glycine max*.

5 SEQ ID NO 16: Nucleinsäuresequenz enthaltend eine codierende Region eines Z.m.-R1 Proteins aus *Zea mays*.

SEQ ID NO 17: Aminosäuresequenz codierend ein Z.m.-R1 Protein aus *Zea mays*.

10

Beschreibung der Abbildungen

Fig. 1: Denaturierendes Acrylamidgel zur Identifizierung von Proteinen aus *Arabidopsis thaliana*, die bevorzugt an nicht-phosphorylierte-Stärke im Vergleich zu phosphorylierter-Stärke binden. In Spur „M“ ist ein Standard Protein Molekulargewichtsmarker aufgetragen. In Spur „-“ sind Proteine, erhalten nach Inkubation des Kontrollansatzes C aus Beispiel 1 d) aufgetragen. In Spur „K“ sind Proteinextrakte von *Arabidopsis thaliana*, erhalten nach Inkubation mit nicht-phosphorylierter-Stärke, isoliert aus Blättern einer *Arabidopsis thaliana* sex1-3 Mutante (Ansatz B, Beispiel 1 d)), aufgetragen. In Spur „P“ sind Proteinextrakte von *Arabidopsis thaliana*, erhalten nach Inkubation mit Stärke, isoliert aus Blättern einer *Arabidopsis thaliana* sex1-3 Mutante, die nachträglich *in vitro* mit einem R1 Protein phosphoryliert wurde (Ansatz A, Beispiel 1 d)) aufgetragen. Nach erfolgter Elektrophorese wurde das Acrylamidgel mit Comassie Blau gefärbt.

25

Fig. 2: Nachweis der Autophosphorylierung des OK1 Proteins. Fig. 2 A) stellt ein nach erfolgter Elektrophorese mit Comassie Blau gefärbtes denaturierendes (SDS) Acrylamidgel dar. Fig. 2 B) zeigt die Autoradiographie eines denaturierenden (SDS) Acrylamidgels. Auf beide Gele wurden jeweils die gleichen Proben zu gleichen Mengen aufgetragen. M: Standard Protein Molekulargewichtsmarker; R1: Probe aus Reaktionsgefäß 1 nach Beispiel 7

(nach Inkubation eines OK1 Proteins mit ATP); R2: Probe aus Reaktionsgefäß 2 nach Beispiel 7 (nach Inkubation eines OK1 Proteins mit ATP wurde das Protein auf 95°C erhitzt); R3: Probe aus Reaktionsgefäß 3 nach Beispiel 7 (nach Inkubation eines OK1 Proteins mit ATP wurde das Protein in 0,5 M HCl inkubiert); R4: Probe aus Reaktionsgefäß 4 nach Beispiel 7 (nach Inkubation eines OK1 Proteins mit ATP wurde das Protein mit 0,5 M NaOH inkubiert).

Fig. 3: Nachweis der Stärke phosphorylierenden Aktivität eines OK1 Proteins (siehe Beispiel 6). OK1 Protein wurde mit nicht-phosphorylierter-Stärke, isoliert aus Blättern einer *Arabidopsis thaliana* *sex1-3* Mutante (Ansatz A) und Stärke, isoliert aus Blättern einer *Arabidopsis thaliana* *sex1-3* Mutante, die nachträglich *in vitro* mit einem R1 Protein phosphoryliert wurde (Ansatz B) inkubiert. Ansatz C entspricht Ansatz B, außer dass dieser Ansatz C ohne OK1 Protein inkubiert wurde. Für jeden Ansatz (A, B, C) wurden je zwei unabhängige Versuche durchgeführt (Versuch 1 und Versuch 2). Graphisch dargestellt sind die jeweiligen Mengen, gemessen in cpm (Counts per minute), an ^{33}P markiertem Phosphat, welches von dem OK1 Protein in nicht-phosphorylierte-Stärke (Ansatz A) und phosphorylierte Stärke (Ansatz B) eingeführt wurde.

Fig. 4: Vergleich der C-Atom-Positionen von Glucosemolekülen der Stärke, die von einem R1 Protein bzw. einem OK1 Protein phosphoryliert werden (siehe Beispiel 9). OK1 Protein (Ansatz A) wurde in Anwesenheit von mit ^{33}P markierten ATP mit Stärke, isoliert aus Blättern einer *Arabidopsis thaliana* *sex1-3* Mutante, die nachträglich *in vitro* mit einem R1 Protein phosphoryliert wurde, inkubiert. R1 Protein (Ansatz B) wurde in Anwesenheit von mit ^{33}P markierten ATP mit Stärke, isoliert aus Blättern einer *Arabidopsis thaliana* *sex1-3* Mutante inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wurde eine Totalhydrolyse der Stärke durchgeführt und die erhaltenen Hydrolyseprodukte mittels HPAE Chromatographie aufgetrennt. Als Standard wurden den Hydrolyseprodukten vor der Auftrennung Glucose-6-Phosphat und Glucose-3-Phosphat zugegeben. Die mittels HPAE Chromatographie aufgetrennten Hydrolyseprodukte wurden in einzelnen Fraktionen aufgesammelt. Mit Fraktion 15 eluierte das zugegebene

Glucose-6-Phosphat und mit Fraktion 17 das zugegebene Glucose-3-Phosphat. Die erhaltenen Fraktionen wurden anschließend auf das Vorliegen von radioaktiv markiertem Phosphat hin untersucht. Die in den einzelnen Fraktionen gemessene Menge an ^{33}P markiertem Phosphat, gemessen in cpm (Counts per minute), welches von dem OK1 Protein oder dem R1 Protein jeweils in die Hydrolyseprodukte der phosphorylierten Stärke eingeführt wurde, ist graphisch dargestellt.

Fig. 5 Nachweis der Autophosphorylierung des OK1 Proteins. Fig. 5 A) stellt einen Western Blot dar. Fig. 5 B) zeigt die Autoradiographie eines denaturierenden (SDS) Acrylamidgels. Auf beide Gele wurden jeweils die gleichen Proben zu gleichen Mengen aufgetragen. Das OK1 Protein wurde entweder mit randomisiertem radioaktiv markiertem ATP oder mit spezifisch in gamma-Position radioaktiv markiertem ATP inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wurden die Proteine entweder auf 30°C oder 95°C erhitzt, oder in 0,5 M NaOH bzw. 0,5 M HCl inkubiert.

Fig. 6 Nachweis der Übertragung des beta-Phosphatrestes von ATP auf Stärke in einer von einem OK1 Protein katalysierten Reaktion. Es wurde zur Phosphorylierung von mittels eines R1 Proteins *in vitro* phosphorylierter Stärke, isoliert aus Blättern einer *Arabidopsis thaliana* *sex1-3* Mutante, durch ein OK1 Protein entweder spezifisch in gamma-Position mit ^{33}P markiertes ATP oder randomisiertes ^{33}P ATP eingesetzt. In den jeweiligen mit „control“ bezeichneten Experimenten wurde kein OK1 Protein zugegeben. Jeder Versuchsansatz wurde zweimal unabhängig voneinander durchgeführt. Die Ergebnisse beider Versuche sind dargestellt.

Allgemeine Methoden

Im Folgenden werden Methoden beschrieben, welche zur Durchführung der erfindungsgemäßen Verfahren verwendet werden können. Diese Methoden stellen

konkrete Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung dar, beschränken die vorliegende Erfindung jedoch nicht auf diese Methoden. Dem Fachmann ist bekannt, dass er durch Modifikation der beschriebenen Methoden und/oder durch Ersetzen einzelner Methodenteile durch alternative Methodenteile die Erfindung in gleicher

5 Weise ausführen kann.

1. Herstellung von Proteinextrakten aus pflanzlichen Geweben

a) Herstellung von Proteinextrakten aus pflanzlichen Geweben

Blattmaterial wird sofort nach der Ernte in flüssigem Stickstoff eingefroren und
10 daraufhin im Mörser unter flüssigem Stickstoff homogenisiert. Das zerkleinerte Blattmaterial wird mit dem ca. 3,5-fachen Volumen (bezogen auf das Gewicht des eingesetzten Blattmaterials) kaltem (4°C) Bindungspuffer versetzt und für 2x 10 s mit einem Ultraturrax (maximale Geschwindigkeit) aufgeschlossen. Nach der ersten Behandlung mit einem Ultraturrax wird das zerkleinerte Blattmaterial auf Eis
15 abgekühlt, bevor die zweite Behandlung erfolgt. Anschließend wird das behandelte Blattmaterial durch ein 100 µm Nylonnetz gegeben und 20 min zentrifugiert (50 ml Zentrifugengefäß, 20.000xg, 4°C).

b) Ausfällen der in den Proteinextrakten enthaltenen Proteine

20 Der nach Zentrifugation nach Schritt a) erhaltene Überstand wird abgenommen und sein Volumen bestimmt. Für das Ausfällen von Proteinen wird Ammoniumsulfat über einen Zeitraum von 30 Minuten kontinuierlich unter Rühren auf Eis bis zu einer Endkonzentration von 75% (Gewicht/Volumen) dem Überstand zugegeben. Anschließend wird der Überstand für eine weitere Stunde auf Eis unter Rühren
25 inkubiert. Die aus dem Überstand ausgefällten Proteine werden bei 20.000xg und 4°C für 10 min pelletiert und das Pellet anschließend in 5 ml Bindungspuffer aufgenommen, d.h. die im Pellet vorliegenden Proteine werden in Lösung gebracht.

c) Entsalzen der ausgefällten Proteine

30 Die gelösten Proteine werden mittels einer mit Sephadex G25 gefüllten PD10-Säule (Amersham Bioscience, Freiburg, Prod. Nr. Säulen: 17-0851-01, Prod. Nr. Sephadex

G25-M: 17-0033-01) bei einer Temperatur von 4°C entsalzt, d.h. auch das zur Ausfällung unter Schritt b) verwendete Ammoniumsulfat wird von den gelösten Proteinen abgetrennt. Die PD10-Säule wird vor dem Auftragen der nach Schritt b) in Lösung gebrachten Proteine mit Bindungspuffer äquilibriert. Dazu werden fünfmal

5 jeweils 5 ml Bindungspuffer über die Säule gegeben. Anschließend werden pro Säule 2,5 ml der nach Schritt b) erhaltenen Proteinlösung auf die Säule gegeben, bevor Proteine mit 3,5 ml Bindungspuffer von der Säule eluiert werden.

d) Bestimmung der Proteinkonzentration

10 Die Proteinkonzentration wird mit einem Bradford-Essay (Biorad, München, Prod. Nr. 500-0006 bestimmt (**Bradford, 1976, Anal. Biochem. 72, 248-254**).

e) Zusammensetzung des Bindungspuffers [

Bindungspuffer: 50 mM HEPES/NaOH (od. KOH), pH 7.2

15 1 mM EDTA

2 mM Dithioerythritol (DTE)

2 mM Benzamidin

2 mM ϵ -Aminocapronsäure

0.5 mM PMSF

20 0.02 % Triton X-100

2. Isolierung von Blattstärke

a) Isolierung von Stärkegranula aus pflanzlichen Geweben

Blattmaterial wird sofort nach der Ernte in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das

Blattmaterial wird im Mörser portionsweise unter flüssigem Stickstoff homogenisiert

25 und in insgesamt dem ca. 2,5-fachen Volumen (Gewicht/Volumen) Stärkepuffer aufgenommen. Diese Suspension wird zusätzlich noch einmal im Waring Blender für 20 s bei maximaler Geschwindigkeit homogenisiert. Das Homogenisat wird durch ein Nylonnetz (100 μ m Maschenweite) gegeben und 5 Minuten bei 1.000xg zentrifugiert. Der Überstand mit den löslichen Proteinen wird verworfen.

30

b) Reinigung der Stärke, isoliert aus pflanzlichen Geweben

Das nach Schritt a) erhaltene Stärke enthaltende Pellet wird nach Entfernen des auf der Stärke oben aufliegenden grünen Materials durch abspülen des grünen Materials mit Stärkepuffer in Stärkepuffer aufgenommen und sukzessive durch Nylonnetze unterschiedlicher Maschenweite (in der Reihenfolge 60 µm, 30 µm, 20 µm) gegeben.

5 Das Filtrat wird über ein 10 ml Percoll-Kissen (95% (v/v) Percoll (Pharmacia, Uppsala, Schweden), 5% (v/v) 0,5M HEPES-KOH pH7,2) zentrifugiert (Correx-Röhrchen, 15 min, 2.000xg) zentrifugiert. Das nach dieser Zentrifugation erhaltene Sediment wird einmal in Stärkepuffer resuspendiert und erneut zentrifugiert (5 min, 1.000xg,).

10

c) Entfernen der an die Stärke gebundenen Proteine

Nach Schritt b) werden Stärkegranula erhalten, welche an Stärke bindende Proteine enthalten. Die an die Oberfläche der Stärkegranula gebundenen Proteine werden durch viermalige Inkubation mit 0,5 % SDS (Natriumlaurylsulfat) für jeweils 10-15

15 Minuten bei Raumtemperatur unter Schütteln entfernt. Nach jedem Waschschritt erfolgt dabei eine Zentrifugation (5 min, 5.000xg), um die Stärkegranula vom betreffenden Waschpuffer abzutrennen.

d) Reinigung von Proteinen befreiter Stärke

20 Die nach Schritt c) erhaltene, von an ihre Oberfläche bindenden Proteinen befreite Stärke, wird anschließend durch viermaliges Inkubieren mit Waschpuffer für jeweils 10-15 Minuten bei Raumtemperatur unter Schütteln entfernt. Nach jedem Waschschritt erfolgt dabei eine Zentrifugation (5 min, 1.000xg), um die Stärkegranula vom betreffenden Waschpuffer abzutrennen. Diese Reinigungsschritte dienen vor 25 allem der Entfernung des bei Inkubationen nach Schritt c) eingesetzten SDS.

e) Bestimmung der Konzentration von isolierter Stärke

Die Menge der Stärke, isoliert nach Schritt d) wird photometrisch bestimmt. Die optische Dichte der Stärkesuspension wird nach geeigneter Verdünnung gegen eine

30 Eichgerade bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen. Der lineare Bereich der Eichgerade befindet sich zwischen 0 und 0,3 Extinktionseinheiten.

Zur Erstellung der Eichgeraden wird Stärke, z.B. isoliert aus Blättern einer *Arabidopsis thaliana* *sex1-3* Mutante unter Vakuum getrocknet, gewogen und in einem definierten Volumen Wasser aufgenommen. Die so erhaltene Suspension wird in mehreren Schritten jeweils im Verhältnis 1 zu 1 mit Wasser verdünnt, bis man eine

5 Suspension von ca. 5 µg Stärke pro ml Wasser enthält. Die durch die einzelnen Verdünnungsschritte erhaltenen Suspensionen werden im Photometer bei einer Wellenlänge von 600 nm vermessen. Die für die jeweiligen Suspensionen erhaltenen Absorptionswerte werden gegen die in der jeweiligen Suspension vorliegende Konzentration der Stärke aufgetragen. Die erhaltene Eichgerade sollte in dem
10 Bereich von 0 µg Stärke pro ml Wasser bis 0,3 µg Stärke pro ml Wasser einer linearen mathematischen Funktion folgen.

f) Aufbewahrung isolierter Stärke

Die Stärke kann entweder direkt, ohne weitere Lagerung für weitere Versuche 15 verwendet werden, oder in Aliquots in 1,5 mL Eppendorfgefäß en bei -20°C gelagert werden. Sowohl die eingefrorene Stärke, als auch nicht gelagerte, frisch isolierte Stärke kann gegebenenfalls z.B. für die in der vorliegenden Erfindung beschriebenen Methoden betreffend *in vitro*-Phosphorylierung und/oder Bindungstest eingesetzt werden.

20

g) Zusammensetzung von verwendeten Puffern

1x Stärkepuffer: 20 mM HEPES-KOH, pH 8.0
0.2 mM EDTA
0.5 % Triton X-100

25

Waschpuffer: 50 mM HEPES/KOH, pH 7,2

3. Rekombinante Expression eines identifizierten Stärke phosphorylierenden Proteins

30 a) Herstellung eines bakteriellen Expressionsvektors enthaltend eine cDNA, die ein Stärke phosphorylierendes Protein codiert

Die cDNA codierend ein Stärke phosphorylierendes Protein kann z.B. unter Verwendung von mRNA oder poly-A-plus-mRNA aus pflanzlichen Geweben als „Template“ mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) amplifiziert werden. Dazu wird zunächst eine reverse-Transkriptase für die Herstellung eines zur einem Stärke 5 phosphorylierenden Protein codierenden mRNA komplementären cDNA Stranges verwendet, bevor der betreffende cDNA Strang mittels DNA-Polymerase amplifiziert wird. So genannte „Kits“ enthaltend Substanzen, Enzyme und Anleitungen zur Durchführung von PCR Reaktionen sind käuflich erwerbbar (z.B. SuperScript™ One-Step RT-PCR System, Invitrogen, Prod. Nr.: 10928-034. Die amplifizierte cDNA 10 codierend ein Stärke phosphorylierendes Protein kann anschließend in einen bakteriellen Expressionsvektor, z.B. pDEST™17 (Invitrogen) kloniert werden. pDEST™17 enthält den T7 Promotor, der zur Initiation der Transkription von der T7-RNA-Polymerase verwendet wird. Weiterhin enthält der Expressionsvektor pDEST™17 in 5'-Richtung vom T7 Promotor eine Shine Dalgarno Sequenz gefolgt 15 von einem Start-Codon (ATG) und von einem so genannten His-tag. Dieser His-tag besteht aus **sechs** direkt hintereinander folgenden Codons, die jeweils die Aminosäure Histidin codieren und befindet sich in dem Leseramen des genannten Start Codons. Die Klonierung einer cDNA, codierend ein Stärke phosphorylierendes Protein in pDEST™17 erfolgt in der Weise, dass eine translationale Fusion zwischen 20 den Codons für das Start Codon, den His-tag und der cDNA codierend ein Stärke phosphorylierendes Protein entsteht. Dadurch wird nach Transkription, initiiert am T7 Promotor und anschließender Translation ein Stärke phosphorylierendes Protein erhalten, welches an seinem N-Terminus zusätzliche Aminosäuren, beinhaltend den His-tag, enthält.

25 Es sind jedoch auch andere zur Expression in Mikroorganismen geeignete Vektoren zur Expression eines Stärke phosphorylierenden Proteins verwendbar. Expressionsvektoren und dazugehörige Expressionsstämme sind dem Fachmann bekannt und in geeigneter Kombination auch käuflich beim entsprechenden Fachhandel erwerbbar.

30 b) Herstellung von Expressionsklonen in *Escherichia coli*

Es wird zunächst ein entsprechender Transformations kompetenter *E. coli* Stamm, der eine T7-RNA-Polymerase chromosomal codiert mit dem nach Schritt a) hergestellten Expressionsplasmid transformiert und anschließend auf durch Agar verfestigtem Nährmedium über Nacht bei 30°C inkubiert. Als Expressionstamm 5 eignen sich z.B. BL21 Stämme (Invitrogen Prod. Nr.: C6010-03 die eine T7-RNA-Polymerase unter Kontrolle eines mittels IPTG induzierbaren Promotor (lacZ) chromosomal codieren.

Aus der Transformation hervorgehende Bakterienkolonien können mit dem Fachmann bekannten Methoden daraufhin untersucht werden, ob sie das 10 gewünschte Expressionsplasmid, enthaltend eine das Stärke phosphorylierende Protein codierende cDNA, enthalten. Es werden dabei Expressionsklone erhalten.

c) Expression eines Stärke phosphorylierenden Proteins in *Escherichia coli*

Zunächst wird eine Vorkultur hergestellt. Dazu wird ein Expressionsklon erhalten 15 nach Schritt b) in 30 ml Terrific Broth (TB-Medium), enthaltend ein Antibiotikum zur Selektion auf Anwesenheit des Expressionsplasmides beimpft und über Nacht bei 30°C unter Schütteln (250 rpm) inkubiert.

Anschließend wird eine Hauptkultur zur Expression eines Stärke phosphorylierenden Proteins hergestellt. Dazu werden jeweils 1 Liter Erlenmeyer-Kolben, enthaltend 20 jeweils 300 ml auf 30°C vorgewärmtes TB-Medium und ein Antibiotikum zur Selektion auf Anwesenheit des Expressionsplasmides mit jeweils 10 ml einer entsprechenden Vorkultur beimpft und bei 30°C unter Schütteln (250 rpm) bis zu einer Optischen Dichte (gemessen bei einer Wellenlänge von 600 nm; OD₆₀₀) von ca. 0,8 inkubiert.

25 Wurde zur Expression eines Stärke phosphorylierenden Proteins ein Expressionsplasmid verwendet, bei welchem die Expression des Stärke phosphorylierenden Proteins mittels eines induzierbaren Systems initiiert wird (z.B. der Expressionsvektor pDEST™17 in BL21 *E. coli* Stämmen, induzierbar mittels IPTG), so wird nach erreichen einer OD₆₀₀ von ca. 0,8 der in Hauptkultur der 30 betreffende Induktor (z.B. IPTG) zugegeben. Nach Zugabe des Induktors wird die Hauptkultur bei 30°C unter Schütteln (250 rpm) inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von ca. 1,8 erreicht ist. Anschließend wird die Hauptkultur für 30 Minuten auf Eis gekühlt, bevor

die Zellen der Hauptkultur durch Zentrifugation (10 Minuten bei 4.000xg und 4°C) vom Kulturmedium abgetrennt werden.

4. Reinigung eines Stärke phosphorylierenden Proteins

5 a) Aufschluss von ein Stärke phosphorylierendes Protein exprimierenden Zellen
Die nach Zentrifugation in Schritt c), Punkt 3 Allgemeine Methoden erhaltenen Zellen
werden in Lysispuffer resuspendiert. Dabei werden ca. 4 ml Lysispuffer zu etwa 1 g
Zellen gegeben. Anschließend werden die resuspendierten Zellen für 30 Minuten auf
Eis inkubiert, bevor sie mit Hilfe einer Ultraschallsonde (Baudelin Sonoplus UW
10 2070, Baudelin electronic, Berlin, Einstellungen: Cycle 6, 70%, 1 Minute) unter
ständiger Kühlung durch Eis aufgeschlossen werden. Dabei ist darauf zu achten,
dass die Zellsuspension während der Ultraschallbehandlung nicht zu stark erwärmt
wird. Die nach der Ultraschallbehandlung erhaltene Suspension wird Zentrifugiert (12
Minuten bei 20.000xg, 4°C) und der nach Zentrifugation erhaltene Überstand wird
15 durch einen Filter mit 45 µm Porengröße filtriert.

b) Reinigung des Stärke phosphorylierenden Proteins

Handelt es sich bei dem in *E. coli* Zellen exprimierten Stärke phosphorylierenden
Protein um ein Fusionsprotein mit einem His-tag, so kann eine Aufreinigung mit Hilfe
20 von Nickelionen erfolgen, an welches das His-tag mit hoher Affinität bindet. Dazu
werden 25 ml des in Schritt d) erhaltenen Filtrates mit 1 ml Ni-Agarose-Slurry
(Qiagen, Prod. Nr.: 30210) versetzt und für 1 Stunde auf Eis inkubiert. Anschließend
wird das Gemisch aus Ni-Agarose-Slurry und Filtrat über eine Polystyren Säule
(Pierce, Prod. Nr.: 29920) gegeben. Der Säulendurchlauf wird verworfen. Die Säule
25 wird zunächst durch Aufgeben von 8 ml Lysispuffer gewaschen, wobei der Durchlauf
erneut verworfen wird. Die Elution des Stärke phosphorylierenden Proteins erfolgt
dann durch fraktioniertes Aufgeben von zweimal jeweils 1 ml E1-Puffer, gefolgt von
einmal 1 ml E2-Puffer und anschließend von fünfmal jeweils 1 ml E3-Puffer auf die
Säule. Der Durchlauf, der bei dem Aufgeben der einzelnen Fraktion der
30 entsprechenden Elutionspuffer (E1-, E2-, E3-Puffer) auf die Säule anfällt, wird in
voneinander getrennten Fraktionen aufgefangen. Aliquots dieser Fraktionen werden

anschließend mittels denaturierender SDS-Acrylamidgelelektrophorese, gefolgt von einer Comassie-Blau Färbung analysiert. Die Fraktionen, welche das Stärke phosphorylierende Protein in ausreichender Menge und zufriedenstellender Reinheit enthalten, werden vereinigt und mit Hilfe von Druckfiltration bei 4°C aufkonzentriert.

5 Die Druckfiltration kann z.B. mit Hilfe einer Amicon-Zelle (Amicon Ultrafiltration Cell, Model 8010, Prod. Nr.: 5121) bei Verwendung einer Diaflo PM30-Membran (Millipore, Prod. Nr.: 13212) bei 4°C erfolgen. Zur Konzentrierung können aber auch andere dem Fachmann bekannte Methoden verwendet werden.

10 c) Zusammensetzung verwendeter Puffer

Lysispuffer: 50 mM HEPES

300 mM NaCl

10 mM Imidazol

pH 8,0 (einstellen mit NaOH)

15 1 mg/ml Lysozym (direkt vor Verwendung des Puffers zugeben)

¼ Tablette pro 10 ml Proteaseinhibitoren Complete EDTA free, (Roche Produkt Nr.: 1873580) (direkt vor Verwendung des Puffers zugeben)

Elutionspuffer E1: 50 mM HEPES

20 300 mM NaCl

50 mM Imidazol

pH 8,0 (einstellen mit NaOH)

Elutionspuffer E2: 50 mM HEPES

25 300 mM NaCl

75 mM Imidazol

pH 8,0 (einstellen mit NaOH)

Elutionspuffer E3: 50 mM HEPES

30 300 mM NaCl

250 mM Imidazol

pH 8,0 (einstellen mit NaOH)

5. Rekombinante Expression eines R1 Proteins

Die Rekombinante Expression eines R1 Proteins ist in der Literatur beschrieben (Ritte et al., 2002, PNAS 99, 7166-7171; Mikkelsen et al., 2004, Biochemical Journal

5 377, 525-532), kann jedoch auch entsprechend der weiter oben unter Punkt 3. Allgemeine Methoden beschriebenen Methode betreffend die Rekombinante Expression eines Stärke phosphorylierenden Proteins durchgeführt werden.

6. Reinigung eines R1 Proteins

10 Die Aufreinigung eines R1 Proteins ist in der Literatur beschrieben (Ritte et al., 2002, PNAS 99, 7166-7171; Mikkelsen et al., 2004, Biochemical Journal 377, 525-532), kann jedoch auch entsprechend der weiter oben unter Punkt 4. Allgemeine Methoden beschriebenen Methode betreffend die Reinigung eines Stärke phosphorylierenden Proteins durchgeführt werden, wenn durch Expression von R1 in 15 *E. coli* Zellen ein R1 Fusionsprotein entsteht, welches einen His-tag enthält.

7. In vitro Herstellung von phosphorylierter-Stärke ausgehend von nicht-phosphorylierter-Stärke

a) In vitro Phosphorylierung von nicht-phosphorylierter-Stärke

20 Stärke, welche kein Stärkephosphat enthält (z.B. isoliert aus Blättern von *Arabidopsis thaliana sex1-3* Mutanten mit Hilfe der oben unter Punkt 2, Allgemeine Methoden beschriebenen Methode) wird mit R1 Puffer und mit gereinigtem R1 Protein (ca. 0,25 µg R1 Protein pro mg Stärke) versetzt, so dass sich ein Stärkegehalt von 25 mg pro ml ergibt. Dieser Reaktionsansatz wird über Nacht (ca. 15 h) bei Raumtemperatur 25 unter Schütteln inkubiert. An die im Reaktionsansatz vorliegende Stärke gebundenes R1 wird nach Abschluss der Reaktion durch vier maliges Waschen mit jeweils ca. 800 µl 0,5 % SDS entfernt. Anschließend wird das noch in der *in vitro* phosphorylierten Stärke vorliegende SDS durch fünf maliges Waschen mit jeweils 1 ml Waschpuffer von entfernt. Alle Waschschrifte finden jeweils bei Raumtemperatur 30 für 10 bis 15 Minuten unter Schütteln statt. Nach jedem Waschschritt erfolgt eine

Zentrifugation (2 min, 10.000xg), um die Stärkegranula vom betreffenden SDS-Puffer oder Waschpuffer abzutrennen.

b) Zusammensetzung verwendeter Puffer

5	R1-Puffer:	50 mM	HEPES/KOH,	pH	7,5
		1 mM	EDTA		
		6 mM	MgCl ₂		
		0,5 mM	ATP		
10	Waschpuffer:	50 mM HEPES/KOH, pH 7,2			

8. Bindung von Proteinen an phosphorylierte-Stärke bzw. nicht-phosphorylierte-Stärke

a) Isolierung von P-Stärke-Protein-Komplexen bzw. nicht-phosphorylierter-Stärke-Protein-Komplexen

Ca. 50 mg P-Stärke, bzw. ca. 50 mg nicht-phosphorylierte Stärke werden in getrennten Ansätzen jeweils in ca. 800 µl Proteinextrakt resuspendiert. Die Proteinkonzentration der Proteinextrakte sollte jeweils ca. 4 mg bis 5 mg pro ml betragen. Die Inkubation der P-Stärke bzw. nicht-phosphorylierten-Stärke mit Proteinextrakten wird bei Raumtemperatur für 15 Minuten unter Schütteln bei 4°C durchgeführt. Nach erfolgter Inkubation werden die Reaktionsansätze über ein Percoll-Kissen (4 ml) abzentrifugiert (15 Minuten, 3500 rpm, 4°C). Nicht an phosphorylierte Stärke bzw. P-Stärke gebundene Proteine befinden sich nach Zentrifugation im Überstand und können mit einer Pasteurpipette abgenommen werden. Der Überstand wird verworfen. Das nach Zentrifugation erhaltene sedimentierte Pellet enthaltend P-Stärke und nicht-phosphorylierte-Stärke inclusive der an die betreffenden Stärken jeweils gebundene Proteine (P-Stärke-Protein-Komplexe bzw. nicht-phosphorylierter-Stärke-Protein-Komplexe), wird zweimal mit je 1 ml Waschpuffer (siehe oben, Allgemeine Methoden unter Punkt 7.b)), durch Inkubation für jeweils 3 Minuten bei 4°C unter Schütteln gewaschen. Nach jedem Waschschritt erfolgt eine Zentrifugation (5 Minuten, 8000 rpm, 4°C in einer

Tischzentrifuge, Hettich EBA 12R), um die P-Stärke, bzw. nicht-phosphorylierte-Stärke von dem Waschpuffer abzutrennen.

b) In Lösung bringen der in den P-Stärke-Protein-Komplexen bzw. nicht-phosphorylierter-Stärke-Protein-Komplexen gebundenen Proteinen

Die nach Schritt a) erhaltenen P-Stärke-Protein-Komplexe bzw. nicht-phosphorylierte-Stärke-Protein-Komplexe werden jeweils in ca. 150 µl SDS-Probenpuffer resuspendiert und 15 Minuten unter Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird die P-Stärke bzw. nicht-phosphorylierte-Stärke von den in Lösung gebrachten Proteinen durch Zentrifugation (1 Minute, 13.000 rpm, Raumtemperatur, Eppendorf Tischzentrifuge) abgetrennt. Der nach Zentrifugation erhaltene Überstand wird zur Entfernung jeglicher Reste von P-Stärke bzw. nicht-phosphorylierte-Stärke noch einmal zentrifugiert (1 Minute, 13.000 rpm, Raumtemperatur, Eppendorf Tischzentrifuge) und abgenommen. Es werden dadurch in Lösung gebrachte Proteine, die an P-Stärke bzw. nicht-phosphorylierte-Stärke binden, erhalten.

c) Zusammensetzung verwendeter Puffer

SDS-Probenpuffer: 187,5 mM Tris/HCl pH 6,8

20	6 %	SDS
	30 %	Glycerin
	~ 0,015 %	Bromphenolblau
	60 mM	DTE (frisch zusetzen!)

25 Percoll: Percoll wird über Nacht gegen eine Lösung, bestehend aus und 25 mM HEPES / KOH, pH 7,0 dialysiert

9. Auf trennung von Proteinen, die an P-Stärke und/oder nicht-phosphorylierte-Stärke binden

30 Die nach Schritt c) unter Punkt 8. Allgemeine Methoden betreffend die Bindung von Proteinen an P-Stärke bzw. nicht-phosphorylierte-Stärke erhaltenen in Lösung

gebrachten Proteine werden jeweils für 5 Minuten bei 95°C inkubiert und anschließend mit Hilfe denaturierender Polyacrylamidgelektrophorese aufgetrennt. Dabei wird für die durch Bindung an P-Stärke und für die durch Bindung an nicht-phosphorylierte-Stärke erhaltenen in Lösung gebrachten Proteine jeweils ein 5 gleiches Volumen auf das Acrylamidgel aufgetragen. Das nach erfolgter Elektrophorese erhaltene Gel wird mindestens über Nacht mit kolloidalem Comassie (Roth, Karlsruhe, Roti-Blue Rod. Nr.: A152.1) gefärbt und anschließend in 30 % Methanol, 5 % Essigsäure, oder in 25% Methanol entfärbt.

10 10. Identifizierung und Isolierung von an P-Stärke und/oder nicht-phosphorylierte-Stärke bindenden Proteinen

a) Identifizierung von Proteinen mit erhöhter Bindungsaktivität gegenüber P-Stärke im Vergleich zu nicht-phosphorylierter-Stärke

Proteine, die, nach Auftrennung mittels Acrylamidgelektrophorese und 15 anschließender Sichtbarmachung durch Färbung (siehe oben, Punkt 9. Allgemeine Methoden), ein verstärktes Signal nach Bindung an P-Stärke im Vergleich zu einem entsprechenden Signal nach Bindung an nicht-phosphorylierte-Stärke zeigen, weisen 20 eine erhöhte Bindungsaktivität gegenüber P-Stärke im Vergleich zu nicht-phosphorylierter-Stärke auf. Dadurch können Proteine, die eine erhöhte Bindungsaktivität gegenüber P-Stärke im Vergleich zu nicht-phosphorylierter-Stärke aufweisen, identifiziert werden. Proteine, die eine erhöhte Bindungsaktivität gegenüber P-Stärke im Vergleich zu nicht-phosphorylierter-Stärke aufweisen, werden aus dem Acrylamidgel ausgeschnitten.

25 Identifizierung der Aminosäuresequenz von Proteinen, die eine erhöhte Bindungsaktivität gegenüber P-Stärke im Vergleich zu nicht-phosphorylierter-Stärke aufweisen

Nach Schritt a) identifizierte Proteine werden mit Trypsin verdaut und die erhaltenen Peptide zur Ermittlung der Massen der erhaltenen Peptide mittels MALDI-TOF 30 analysiert. Trypsin ist eine sequenzspezifische Protease, d.h. Trypsin spaltet Proteine an einer vorgegebenen Stelle nur dann, wenn die betreffenden Proteine

bestimmte Aminosäuresequenzen enthalten. Trypsin spaltet Peptidbindungen immer dann, wenn vom N-Terminus ausgehend die Aminosäuren Arginin und Lysin aufeinander folgen. Dadurch ist es möglich, sämtliche Peptide, die nach Trypsin Verdau einer Aminosäuresequenz entstehen würden, theoretisch zu ermitteln. Durch 5 die Kenntnis der die theoretisch ermittelten Peptide codierenden Aminosäuren können auch die Massen der Peptide, die nach theoretischem Trypsin Verdau erhalten werden, ermittelt werden. Datenbanken (z.B. NCBIInr <http://prospector.ucsf.edu/ucsfhtml4.0/msfit.htm>; Swissprot <http://cbrg.inf.ethz.ch/Server/MassSearch.html>) die Informationen über die Massen 10 von Peptiden nach theoretischem Trypsin Verdau enthalten, können daher mit den real mittels MALDI-TOF-MS erhaltenen Massen von Peptiden unbekannter Proteine verglichen werden. Aminosäuresequenzen, die gleiche Peptidmassen nach theoretischem und/oder realem Trypsin Verdau aufweisen, sind als identisch anzusehen. Die betreffenden Datenbanken enthalten sowohl Peptidmassen von 15 Proteinen, deren Funktion bereits nachgewiesen wurde, als auch Peptidmassen von Proteinen, welche bisher nur hypothetisch durch Ableitung von Aminosäuresequenzen ausgehend von in Sequenzierprojekten erhaltenen Nucleinsäuresequenzen existieren. Die tatsächliche Existenz und die Funktion solcher hypothetischen Proteine ist daher selten nachgewiesen und wenn überhaupt 20 eine Funktion angegeben ist, dann beruht diese meist alleinig auf Vorhersagen, jedoch nicht auf einem tatsächlichen Nachweis der Funktion.

Banden, enthaltend nach Schritt a) identifizierte Proteine werden aus dem Acrylamidgel ausgeschnitten; das ausgeschnittene Acrylamidstück wird zerkleinert und durch Inkubation für ca. eine halbe Stunde bei 37°C in ca. 1 ml 60% 50mM 25 NH₄HCO₃, 40% Acetonitril entfärbt. Anschließend wird die Entfärbelösung abgenommen und das verbleibende Gel unter Vakuum (z.B. Speedvac) getrocknet. Nach Trocknung wird Trypsinlösung zum Verdau des in dem betreffenden Gelstück enthaltenen Proteins hinzu gegeben. Der Verdau erfolgt über Nacht bei 37°C. Nach 30 dem Verdau wird wenig (bis das Acrylamidgel sich weißlich färbt) Acetonitril zugegeben und der Ansatz unter Vakuum (z.B. Speedvac) getrocknet. Nach erfolgter Trocknung wird so viel 5%ige Ameisensäure zugegeben, dass die getrockneten Bestandteile gerade bedeckt sind und für einige Minuten bei 37°C inkubiert. Die

Behandlung mit Acetonitril gefolgt von der Trocknung wird einmal wiederholt. Anschließend werden die getrockneten Bestandteile in 0,1% TFA (Trifluoressigsäure, 5 µl bis 10 µl) aufgenommen und in ca. 0,5 µl Portionen auf einen Träger aufgetropft. Auf den Träger werden ebenfalls gleiche Mengen Matrix (ϵ -Cyano-4-5 hydroxyzimtsäure) aufgegeben. Nach Auskristallisieren der Matrix werden die 10 Massen der Peptide mittels MALDI-TOF-MS-MS (z.B. Burker ReflexTM II, Bruker Daltonic, Bremen) ermittelt. Mit den erhaltenen Massen werden Datenbanken auf Aminosäuresequenzen hin durchsucht, welche nach theoretischem Trypsinverdau gleiche Massen ergeben. Somit können Aminosäuresequenzen identifiziert werden, welche Proteine codieren, die bevorzugt an phosphorylierte alpha-1,4-Glucane binden und/oder P-alpha-1,4-Glucane als Substart benötigen.

11. Verfahren zum Nachweis von Stärke phosphorylierender Aktivität eines Proteins

15 a) Inkubation von Proteinen mit P-Stärke und/oder nicht-phosphorylierter-Stärke Um nachzuweisen, ob ein Protein eine Stärke phosphorylierende Aktivität aufweist, können zu untersuchende Proteine mit Stärke und radioaktiv markiertem ATP inkubiert werden. Dazu werden ca. 5 mg P-Stärke bzw. ca. 5 mg nicht-phosphorylierte-Stärke mit dem zu untersuchenden Protein (**0,01 µg bis 5,0 µg pro 20 mg eingesetzter Stärke**) in 500 µl Phosphorylierungspuffer für 10 Minuten bis 30 Minuten bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Anschließend wird die Reaktion durch Zugabe von SDS bis zu einer Konzentration von 2% (Gewicht/Volumen) gestoppt. Die im jeweiligen Reaktionsgemisch vorliegenden Stärkegranula werden abzentrifugiert (1 Minute, 13.000xg), einmal mit 900 µl einer 2 25 % SDS Lösung und jeweils viermal mit 900 µl einer 2 mM ATP Lösung gewaschen. Jeder Waschschritt wird für 15 Minuten bei Raumtemperatur unter Schütteln durchgeführt. Nach jedem Waschschritt werden die Stärkegranula durch Zentrifugation (1 Minute, 13.000xg) vom betreffenden Waschpuffer abgetrennt. Zusätzlich sollten bei der Durchführung eines Experimentes zum Nachweis von 30 Stärke phosphorylierender Aktivität eines Proteins weitere Reaktionsansätze, die kein Protein oder inaktiviertes Protein enthalten, ansonsten aber in gleicher Weise

wie die beschriebenen Reaktionsansätze behandelt werden, als so genannte Kontrollen mitgeführt werden.

b) Ermittlung der Menge an durch enzymatische Aktivität in die P-Stärke und/oder nicht-phosphorylierte-Stärke eingebauten Phosphatreste

5 Die nach Schritt a) erhaltenen Stärkegranula können auf das Vorliegen von radioaktiv markierten Phosphatresten hin untersucht werden. Dazu wird die jeweilige Stärke in je 100 µl Wasser resuspendiert und mit jeweils 3 ml Scintillationscocktail (z.B. Ready Safe™, BECKMANN Coulter) versetzt und anschließend mit Hilfe eines 10 Scintillationszählers (z.B. LS 6500 Multi-Purpose Scintillation Counter, BECKMANN COULTER™) analysiert.

c) Identifizierung von Proteinen, die bevorzugt P-Stärke als Substart verwenden

Wird ein Protein in getrennten Ansätzen einmal mit P-Stärke und einmal mit nicht- 15 phosphorylierter-Stärke nach der unter a) beschriebenen Methode inkubiert, so kann durch Vergleich der nach Schritt b) erhaltenen Werte für das Vorliegen von Stärkephosphat ermittelt werden, ob das betreffende Protein mehr Phosphat in P-Stärke im Vergleich zu nicht-phosphorylierter-Stärke eingebaut hat. Damit können auch Proteine identifiziert werden, die Phosphat in P-Stärke, nicht jedoch in nicht- 20 phosphorylierte-Stärke einführen können. D.h. es können Proteine identifiziert werden, die bereits phosphorylierte Stärke als Substart für eine weitere Phosphorylierungsreaktion benötigen.

d) Zusammensetzung verwendeter Puffer

25 Phosphorylierungs-Puffer:

50 mM HEPES/KOH, pH 7,5

1 mM EDTA

6 mM MgCl₂

0,01 bis 0,5 mM ATP

30 0,2 bis 2 µCi pro ml randomisiertes ³³P-ATP (alternativ kann auch ATP eingesetzt werden, welches einen spezifisch in beta-Position markierten Phosphatrest enthält)

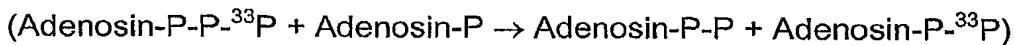
Unter dem Begriff „randomisiertes ATP“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung ATP verstanden werden, welches sowohl in gamma-Position, als auch in beta-Position markierte Phosphatreste enthält (Ritte et al. 2002, PNAS 99, 7166-

5 7171). Randomisiertes ATP wird in der wissenschaftlichen Literatur auch als Beta/gamma-ATP bezeichnet. Eine Methode zur Herstellung von randomisiertem ATP ist im Folgenden beschrieben.

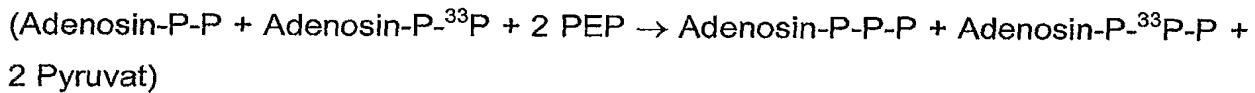
i) Herstellung von randomisiertem ATP

Der hier beschriebenen Methode zur Herstellung von randomisiertem ATP mit Hilfe 10 von Enzym katalysierten Reaktionen liegen folgende Reaktionsmechanismen zu Grunde:

1. Reaktionsschritt:



15 2. Reaktionsschritt:



Die Reaktionsgleichgewichte liegen auf Produktseite, trotzdem entsteht bei dieser 20 Reaktion eine Mischung aus größtenteils $\beta^{33}\text{P-ATP}$ und etwas $\gamma^{33}\text{P-ATP}$.

ii) Durchführung des 1. Reaktionsschrittes

ATP (100 μCi , 3000 Ci pro mmol), welches einen in gamma-Position mit ^{33}P markierten Phosphatrest enthält (Hartmann Analytic, 10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$), wird mit 2 μl 25 Myokinase (AMP-phosphotransferase, aus Kaninchen Muskel; SIGMA, Prod. Nr.: M3003 3,8 mg/ml, 1,626 Units/mg) in 90 μl Randomisierungspuffer für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wird die Reaktion durch Inkubation für 12 Minuten bei 95°C gestoppt, bevor der Reaktionsansatz mittels Zentrifugalfiltration über einen Microcon YM 10 Filter (Amicon, Millipore Prod. Nr. 42407) bei 14.000xg für 30 mindestens 10 Minuten aufgereinigt wird.

iii) Durchführung des 2. Reaktionsschrittes

Dem in Schritt ii) erhaltenen Filtrat werden 2 µl Pyruvatkinase (zur Herstellung einer entsprechenden Lösung siehe unten) und 3 µl 50 mM PEP (Phosphoenolpyruvat) zugegeben. Diese Reaktionsgemisch wird für 45 Minuten bei 30°C inkubiert, bevor

5 wird das Reaktionsgemisch zentrifugiert (2 Minuten, 12.000 rpm in einer Eppendorftischzentrifuge). Der nach Zentrifugation erhaltene, randomisiertes ATP enthaltende Überstand wird abgenommen, aliquotiert und kann bei -20°C gelagert werden.

10 Herstellung der Pyruvatkinase Lösung

15 µl Pyruvatkinase (aus Kaninchenmuskel, Roche, Prod. Nr. 12815), 10 mg/ml, 200 Units/mg bei 25 °C werden abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 27 µl Pyruvatkinasepuffer aufgenommen.

iv) Verwendete Puffer

15 Pyruvatkinasepuffer: 50 mM HEPES/KOH pH 7,5
1 mM EDTA

Randomisierungspuffer: 100 mM HEPES/KOH pH 7,5

1 mM EDTA

20 10 % Glycerol
5 mM MgCl₂
5 mM KCl
0,1 mM ATP
0,3 mM AMP

25

12. Nachweis der Autophosphorylierung eines Proteins

Um nachzuweisen, ob ein Protein eine autophosphorylierende Aktivität aufweist, können zu untersuchende Proteine mit radioaktiv markiertem ATP inkubiert werden.

Dazu werden zu untersuchende Proteine (50 µg bis 100 µg) in 220 µl

30 Phosphorylierungspuffer (siehe oben, Punkt 12 d), Allgemeine Methoden) für 30 Minuten bis 90 Minuten bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Anschließend

wird die Reaktion durch Zugabe von EDTA bis zu einer Endkonzentration von 0,11 M gestoppt. Ca. 2 µg bis 4 µg Protein werden mit Hilfe denaturierender Polyacrylamidgelektrophorese (7,5%iges Acrylamidgel) aufgetrennt. Das nach Polyacrylamidgelektrophorese erhaltene Gel wird einer Autoradiographie 5 unterzogen. Proteine, die in der Autoradiographie ein Signal zeigen, tragen einen radioaktiven Phosphatrest.

13. Identifizierung der C-Atom-Positionen der Glucosemoleküle eines alpha-1,4-Glucans, in welche Phosphatreste durch ein Stärke 10 phosphorylierendes Protein eingeführt werden

Welche C-Atom-Positionen der Glucosemoleküle eines alpha-1,4-Glucans von einem Protein phosphoryliert werden, kann durch Hydrolyse der durch ein betreffendes Protein *in vitro* phosphorylierten erhaltenen Glucane, anschließender Auftrennung der nach Hydrolyse erhaltenen Glucosemonomere, gefolgt von Messung des durch 15 ein betreffendes Protein eingebautes Phosphat in bestimmte Fraktionen der Glucosemoleküle geführt nachgewiesen werden.

a) Totalhydrolyse der alpha-1,4-Glucane

Alpha-1,4-Glucan enthaltende Wasser-Suspensionen werden zentrifugiert, das 20 sedimentierte Pellet anschließend in 0,7 M HCl (Baker, zur Analyse) resuspendiert und unter Schütteln für 2 Stunden bei 95°C inkubiert. Nach erfolgter Inkubation werden die Proben kurz abgekühlt und zentrifugiert (z.B. 2 Minuten 10.000xg). Der erhaltene Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und durch Zugabe von 2 M NaOH (Baker, zur Analyse) neutralisiert. Falls ein Pellet zurück bleibt, wird 25 es in 100 µl Wasser resuspendiert und die Menge des darin vorliegenden markierten Phosphates zur Kontrolle bestimmt.

Der neutralisierte Überstand wird anschließend über einen 10 kDa Filter zentrifugiert. Durch Messung eines Aliquots des erhaltenen Filtrates wird die Menge an markiertem Phosphat im Filtrat z.B. mit Hilfe eines Scintillationszählers bestimmt.

b) Fraktionierung der Hydrolyseprodukte und Ermittlung der phosphorylierten C-Atom Positionen

Die mittels Schritt a) erhaltenen neutralisierten Filtrate der Hydrolyseprodukte können (bei Verwendung von radioaktiv markiertem ATP etwa 3.000 cpm) mit Hilfe von z.B.

5 Hoch-Druck-Anionenaustausch-Chromatographie (HPAE) aufgetrennt werden. Zur Einstellung des für die HPAE benötigten Volumens kann das neutralisierte Filtrat mit H₂O verdünnt werden. Weiterhin wird den entsprechenden Filtraten als interne Kontrolle jeweils Glucose-6-Phosphat (ca. 0,15 mM) und Glucose-3-Phosphat (ca. 0,3 mM) zugegeben. Die Auftrennung mittels HPAE kann z.B. mit Hilfe einer Dionex 10 Anlage DX 600 Bio Lc unter Verwendung einer CarboPac PA 100 Säule (mit entsprechender Vorsäule) und eines gepulsten amperometrischen Detektors (ED 50) Detektors erfolgen. Dabei wird vor Injektion der Probe die Säule zunächst für 10 Minuten mit 99% Eluent C und 1% Eluent D gespült. Anschließend werden jeweils 60 µl Probenvolumen injiziert. Die Elution der Probe erfolgt durch folgende 15 Bedingungen:

Flußrate: 1 ml pro Minute

Gradient: linear ansteigend von 0 Minuten bis 30 Minuten

		Eluent C	Eluent D
	0 Minuten	99%	1%
20	30 Minuten	0%	100%
	35 Minuten	0%	100%
Stop des Laufes			

Die von der Säule eluierten Hydrolyseprodukte werden in einzelnen Fraktionen von 25 je 1 ml aufgefangen. Da den injizierten Proben der Hydrolyseprodukte jeweils nicht markiertes Glucose-3-Phosphat (Ritte et al. 2002, PNAS 99, 7166-7171) und nicht markiertes Glucose-6-Phosphat (Sigma, Prod. Nr.: G7879) als interne Standards zugemischt wurden, können mittels gepulster amperometrischer Detektion die Fraktionen ermittelt werden, welche entweder Glucose-3-Phosphat oder Glucose-6-30 Phosphat enthalten. Durch Messung der Menge an markierten Phosphaten in den einzelnen Fraktionen und anschließendem Vergleich mit den Fraktionen, welche Glucose-3-Phosphat oder Glucose-6-Phosphat enthalten, können damit diejenigen

Fraktionen ermittelt werden, in welchen markiertes Glucose-6-Phosphat oder markiertes Glucose-3-Phosphat enthalten ist. Die Menge des markierten Phosphates in den betreffenden Fraktion wird bestimmt. Durch die Verhältnisse der für markiertes Phosphat gemessenen Mengen an Glucose-3-Phosphat zu Glucose-6-Phosphat in 5 den einzelnen Hydrolyseprodukten, kann nun ermittelt werden, welche C-Atom-Position von einem alpha-1,4-Glucan phosphorylierenden Enzym bevorzugt phosphoryliert wird.

c) Verwendete Puffer

10 Eluent C: 100 mM NaOH
Eluent D: 100 mM NaOH
500 mM Natriumacetat

14. Transformation von Reispflanzen

15 Reispflanzen wurden nach der von Hiei et al. (1994, Plant Journal 6(2), 271-282) beschriebenen Methode transformiert.

15. Transformation von Weizenpflanzen

Weizenpflanzen wurden nach der bei Becker et al. (1994, Plant Journal 5, 299-307) 20 beschriebenen Methode transformiert.

16. Transformation von Maispflanzen

Unreife Embryonen von Maispflanzen der Linie A188 wurden nach der bei Ishida et al. (1996, Nature Biotechnology 14, 745-750) beschriebenen Methode transformiert.

25

17. Bestimmung des Gehaltes an Stärkephosphat

a) Bestimmung des C-6-Phosphatgehaltes

In der Stärke können die Positionen C2, C3 und C6 der Glukoseeinheiten phosphoryliert sein. Zur Bestimmung des C6-P-Gehaltes der Stärke werden 50 mg

Stärke in 500 μ l 0,7 M HCl 4 h bei 95°C hydrolysiert. Anschließend werden die Ansätze für 10 min bei 15500 g zentrifugiert und die Überstände abgenommen. Von den Überständen werden 7 μ l mit 193 μ l Imidazol-Puffer (100 mM Imidazol, pH 7,4; 5 mM $MgCl_2$, 1 mM EDTA und 0,4 mM NAD) gemischt. Die Messung wurde im 5 Photometer bei 340 nm durchgeführt. Nach der Etablierung einer Basisabsorption wurde die Enzymreaktion durch die Zugabe von 2 Einheiten (units) Glukose-6-Phosphat Dehydrogenase (von *Leuconostoc mesenteroides*, Boehringer Mannheim) gestartet. Die Absorptionsänderung ist direkt proportional zur Konzentration des G-6-P Gehaltes der Stärke.

10

b) Bestimmung des Gesamtphosphatgehaltes

Die Bestimmung des Gesamtphosphatgehaltes erfolgte nach der Methode von Ames (Methods in Enzymology VIII, (1966), 115-118).

Es werden ca. 50 mg Stärke mit 30 μ l ethanolischer Magnesiumnitrat-Lösung 15 versetzt und drei Stunden bei 500°C im Muffelofen verascht. Der Rückstand wird mit 300 μ l 0,5 M Salzsäure versetzt und 30 min bei 60°C inkubiert. Anschließend wird ein Aliquot auf 300 μ l 0,5 M Salzsäure aufgefüllt, zu einer Mischung aus 100 μ l 10%iger Ascorbinsäure und 600 μ l 0,42% Ammoniummolybdat in 2 M Schwefelsäure gegeben und 20 min bei 45°C inkubiert.

20

c) Bestimmung des Gehaltes an C-6-Phosphat und C-3-Phosphat

Zur Bestimmung des Gehaltes an Phosphat, welcher in C-6-Position und in C-3-Position der Glucosemoleküle eines alpha-1,4-Glucans gebunden ist, können die betreffenden Glucane nach Totalhydrolyse nach der unter Allgemeine Methoden 13 angeführten Methode mittels HPAE aufgetrennt werden. Die Mengen an Glucose-6-Phosphat und Glucose-3-Phosphat können durch Integration der einzelnen, nach HPEA Aufrennung erhaltenen Peakflächen ermittelt werden. Durch Vergleich der erhaltenen Peakflächen für Glucose-6-Phosphat und Glucose-3-Phosphat in unbekannten Proben, mit den Peakflächen, die nach Auftrennung mittels HPEA mit 25 bekannten Mengen an Glucose-6-Phosphat und Glucose-3-Phosphat erhalten werden, kann die Menge von Glucose-6-Phosphat und Glucose-3-Phosphat in den 30 zu untersuchenden Proben bestimmt werden.

Beispiele

5 1. Isolierung eines Proteins aus *Arabidopsis thaliana*, welches eine erhöhte Bindungsaktivität gegenüber P-Stärke im Vergleich zu nicht-phosphorylierter-Stärke aufweist

a) Herstellung von Proteinextrakten aus *Arabidopsis thaliana*
Proteinextrakte wurden aus etwa 7 g Blättern (**Frischgewicht**) von *Arabidopsis thaliana* (Ökotyp Columbia, Col-O) nach dem unter Punkt 1, Allgemeine Methoden beschriebenen Verfahren hergestellt.

10 b) Isolierung von Stärkegranula aus Blättern von sex1-3 Mutanten von *Arabidopsis thaliana*
Stärkegranula wurden aus etwa 20 g (Frischgewicht) aus Blättern einer sex1-3 Mutante von *Arabidopsis thaliana* nach dem unter Punkt 2., Allgemeine Methoden beschriebenen Verfahren isoliert.

15 c) *In vitro* Phosphorylierung von Stärke, isoliert aus einer sex1-3 Mutante von *Arabidopsis thaliana* mit gereinigtem R1 Protein
Etwa 30 mg nicht-phosphorylierte-Stärke, isoliert aus einer sex1-3 Mutante von *Arabidopsis thaliana* wurde nach dem unter Punkt 7., Allgemeine Methoden beschriebenen Verfahren mittels eines rekombinant in *E. coli* exprimierten und gereinigten R1 Proteins phosphoryliert. Zur Expression des R1 Proteins in *E. coli* und 20 zur anschließenden Aufreinigung wurden die bei Ritte et al. (2002, PNAS 99, 7166-7171) beschriebenen Verfahren verwendet.

25 d) Isolierung von Proteinen, die an P-Stärke und/oder nicht-phosphorylierte-Stärke binden
Proteinextrakte von *Arabidopsis thaliana*, erhalten nach Schritt a) wurden in einem Ansatz A mit 50 mg der nach Schritt c) hergestellten *in vitro* phosphorylierten Stärke

nach dem unter Punkt 8 a), Allgemeine Methoden beschriebenen Verfahren inkubiert und gewaschen.

In einem zweiten Ansatz B wurden Proteinextrakte von *Arabidopsis thaliana*, erhalten nach Schritt a) mit 50 mg der nach Schritt b) hergestellten nicht-phosphorylierten-

5 Stärke nach dem unter Punkt 8 a), Allgemeine Methoden beschriebenen Verfahren inkubiert und gewaschen.

Anschließend wurden die an P-Stärke des Ansatzes A und die an nicht-phosphorylierte-Stärke des Ansatzes B nach dem unter Punkt 8 b), Allgemeine Methoden beschriebenen Verfahren in Lösung gebracht.

10 In einem dritten Ansatz C wurden 50 mg der nach Schritt c) hergestellten *in vitro* phosphorylierten Stärke nach dem unter Punkt 8 a), Allgemeine Methoden beschriebenen Verfahren inkubiert und gewaschen. Ansatz C enthielt jedoch keinen Proteinextrakt.

15 e) Auf trennung der nach Schritt d) erhaltenen Proteine mittels Acrylamidgelektrophorese

Die in Schritt d) erhaltenen Proteine der Ansätze A, B und C wurden mittels einem 9%igem Acrylamidgel unter denaturierenden Bedingungen (SDS) nach dem unter Punkt 9., Allgemeine Methoden beschriebenen Verfahren aufgetrennt und

20 anschließend mit Comassie Blau gefärbt. Das gefärbte Gel ist in Fig. 1 dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass ein Protein, welches im denaturierenden Acrylamidgel bezogen auf eine Proteinstandardmarker (Spur M) ein Molekulargewicht von ca. 130 kDa aufweist, bevorzugt an phosphorylierte Stärke Spur P) im Vergleich zu nicht-phosphorylierter-Stärke (K) bindet.

25

f) Identifizierung des Proteins, das bevorzugt an P-Stärke im Vergleich zu nicht-phosphorylierter-Stärke bindet

Die in Schritt e) identifizierte Bande des Proteins mit einem Molekulargewicht von ca. 130 kDa wurde aus dem Gel ausgeschnitten. Anschließend wurde das Protein wie

30 unter Allgemeine Methoden 10 b) beschrieben, aus dem Acrylamid herausgelöst, mit Trypsin verdaut und die erhaltenen Peptidmassen mittels MALD-TOF-MS bestimmt. Der durch MALDI-TOF-MS erhaltene so genannte „Fingerprint“ wurde mit in

Datenbanken (Mascot: http://www.matrixscience.com/search_form_select.html; ProFound: http://129.85.19.192/profound_bin/WebProFound.exe; PepSea: <http://195.41.108.38/PepSealIntro.html>) enthaltenen Fingerprints theoretisch verdauter Aminosäuremoleküle verglichen. Da ein solcher Fingerprint sehr spezifisch

5 für ein Protein ist, konnte ein Aminosäuremolekül identifiziert werden. Mit Hilfe der Sequenz dieses Aminosäuremoleküls konnte eine ein OK1 Protein codierende Nucleinsäuresequenz aus *Arabidopsis thaliana* isoliert werden. Das mit diesem Verfahren identifizierte Protein wurde mit A.t.-OK1 bezeichnet. Nach Analyse der Aminosäuresequenz des OK1 Proteins aus *Arabidopsis thaliana*, ergab sich, dass

10 diese von der in der Datenbank vorliegenden Sequenz (NP 198009, NCBI) abweicht. Die in SEQ ID No 2 dargestellte Aminosäuresequenz codiert das A.t.-OK1 Protein. SEQ ID No 2 enthält im Vergleich mit der Sequenz der Datenbank (Acc.: NP 198009.1, NCBI) Anweichungen. Die in SEQ ID No 2 enthaltenen Aminosäuren 519 bis 523 (WRLCE) und 762 bis 766 (VRARQ) sind nicht in der Sequenz, welche in der

15 Datenbank vorliegt (ACC.: NP 198009.1) enthalten. Gegenüber der Version 2 der Datenbanksequenz (Acc.: NP 198009.2) enthält die in SEQ ID NO 2 dargestellte Aminosäuresequenz noch die zusätzlichen Aminosäuren 519 bis 523 (WRLCE).

2. Klonierung einer cDNA, die das identifizierte OK1 Protein codiert

Die A.t.-OK1 cDNA wurde mit Hilfe reverser PCR unter Verwendung von mRNA, isoliert aus Blättern von *Arabidopsis thaliana* isoliert. Dazu wurde ein cDNA Strang mittels reverser Transkriptase SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT PCR, Invitrogen Prod. Nr.: 11904-018 synthetisiert, welcher dann unter Verwendung von DNA Polymerase amplifiziert (Expand High Fidelity PCR Systems, Roche Prod. Nr.: 1732641) wurde. Das erhaltene Amplifikat dieser PCR Reaktion wurde in den Vektor pGEM®-T (Invitrogen Prod. Nr.: A3600) kloniert. Das erhaltene Plasmid wird mit A.t.-OK1-pGEM bezeichnet, die das A.t.-OK1 Protein codierende cDNA Sequenz wurde ermittelt und ist unter SEQ ID NO. 1 dargestellt.

Die unter SEQ ID NO 1 dargestellte Sequenz entspricht nicht der Sequenz, die in der Datenbank enthalten ist. Diese wurde oben bereits für die Aminosäuresequenz,

30 codierend ein A.t.-OK1 Protein diskutiert.

Verwendete Bedingungen für die Amplifikation der cDNA codierend das A.t.-OK1 Proteins

Erststrangsynthese:

Es wurden die vom Hersteller angegebenen Bedingungen und Puffer verwendet. Der

5 Reaktionsansatz für die Erststrangsynthese enthielt außerdem folgende Substanzen:

3 µg Gesamt-RNA

5 µM 3'-Primer (OK1rev1: 5'-GACTCAACCACATAACACACAAAGATC)

0,83 µM dNTP Mix

Der Reaktionsansatz wurde für 5 Minuten bei 75°C inkubiert und anschließend auf

10 Raumtemperatur abgekühlt.

Anschließend wurden 1st Strand buffer, RNase Inhibitor und DTT zugegeben und für 2 Minuten bei 42°C inkubiert, bevor 1 µL Superscript RT DNA Polymerase zugegeben wurde und der Reaktionsansatz für 50 Minuten bei 42°C inkubiert wurde.

Bedingungen Für die Amplifikation des Erststranges mittels PCR:

15 1 µL des Reaktionsansatzes der Erststrangsynthese

0.25 µM 3'Primer (OK1rev2: 5'- TGGTAACGAGGCAAATGCAGA)

0.25 µM 5'Primer (OK1fwd2: 5'- ATCTCTTATCACACCACCTCCAATG)

Reaktionsbedingungen:

Schritt 1 95°C 2 min

20 Schritt 2 94°C 20 sec

Schritt 3 62°C 30 sec (Temp. pro Zyklus -0,67°C) (30 s), 68°C (

Schritt 4 68°C 4 Minuten

Schritt 5 94°C 20 sec

Schritt 6 56°C 30 sec

25 Schritt 7 68°C 4 Minuten

Schritt 8 68°C 10 Minuten

Zunächst wurde die Reaktion nach den Schritten 1 bis 4 durchgeführt. Zwischen Schritt 4 und Schritt 2 folgten 10 Wiederholungen (Zyklen), wobei die Temperatur des Schrittes 3 nach jedem Zyklus um 0,67°C verringert wurde. Anschließend

30 erfolgte die Reaktion nach den in Schritten 5 bis 8 angegebenen Bedingungen.

Zwischen Schritt 7 und Schritt 5 folgten 25 Wiederholungen (Zyklen), wobei die Zeit

des Schrittes 7 je Zyklus um 5 sec verlängert wurde. Nach erfolgter Reaktion wurde die Reaktion auf 4°C gekühlt.

3. Herstellung eines Vektors, zur rekombinanten Expression der cDNA des OK1 Proteins

5 Die Sequenz codierend das OK1 Protein aus *Arabidopsis thaliana* wurde nach Amplifikation mittels PCR durch Verwendung des Plasmides A.t.-OK1-pGEM als Template unter Verwendung der Gateway Technologie (Invitrogen) zunächst in den Vektor pDONOR™ 201 (Invitrogen Prod. Nr.: 11798-014) kloniert. Anschließend wurde die codierende Region des OK1 Proteins aus dem erhaltenen Vektor durch 10 sequenzspezifische Rekombination in den Expressionsvektor pDEST17™ (Invitrogen Prod. Nr.: 11803-014) kloniert. Der erhaltene Expressionsvektor wird mit A.t.-OK1-pDEST™17 bezeichnet. Durch die Klonierung entstand eine translationale Fusion der das A.t.-OK1 Protein codierenden cDNA mit in dem Expressionssvektor pDEST™17 vorliegenden Nucleotiden. Die aus dem Vektor pDEST™17 stammenden Nucleotide, 15 die mit der cDNA codierend das A.t.-OK1 Protein translational fusioniert sind, codieren 21 Aminosäuren. Diese 21 Aminosäuren umfassen u.a. das Start Codon (ATG) und einen so genannten His-tag (6 Histidinreste direkt hintereinander). Nach Translation dieser translational fusionierten Sequenzen entsteht dadurch ein A.t.-OK1 Protein, welches an seinem N-terminus die zusätzlichen 21 Aminosäuren, 20 codiert durch Nucleotide, stammend aus dem Vektor aufweist. Das aus diesem Vektor resultierende rekombinante A.t.-OK1-Protein enthält daher 21, aus dem Vektor pDEST™17 stammende, zusätzliche Aminosäuren an seinem N-Terminus.

4. Heterologe Expression des OK1 Proteins in *E. coli*

25 Der nach Beispiel 3 erhaltene Expressionsvektorektor A.t.-OK1-pDEST™17 wurde in den *E. coli* Stamm BL21 Star™ (DE3) (Invitrogen, Prod. Nr. C6010-03) transformiert. Eine Beschreibung dieses Expressionssystems ist bereits weiter oben (siehe Punkt 3., Allgemeine Methoden) erfolgt. Aus der Transformation resultierende Bakterienklone, 30 enthaltend den Vektor A.t.-OK1-pDEST™17, dienten zunächst zur Herstellung einer Vorkultur, die anschließend zur Beimpfung einer Hauptkultur verwendet wurde (siehe

Punkt 3.c), Allgemeine Methoden). Vorkultur und Hauptkultur wurden jeweils bei 30°C unter Schütteln (250 rpm) inkubiert. Nachdem die Hauptkultur eine OD₆₀₀ von ca. 0,8 erreicht hatte wurde die Expression des rekombinanten A.t.-OK1 Proteins durch Zugabe von IPTG (Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranosid) bis zu einer 5 Endkonzentration von 1 mM induziert. Nach Zugabe von IPTG wird die Hauptkultur bei 30°C unter Schütteln (250 rpm) inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von ca. 1,8 erreicht war. Anschließend wurde die Hauptkultur für 30 Minuten auf Eis gekühlt, bevor die Zellen der Hauptkultur durch Zentrifugation (10 Minuten bei 4.000xg und 4°C) vom Kulturmedium abgetrennt wurden.

10

5. Reinigung des rekombinant exprimierten OK1 Proteins

Die Reinigung und Aufkonzentration des A.t.-OK1 Proteins aus Zellen, erhalten nach Beispiel 4, wurde nach dem unter Punkt 4, Allgemeine Methoden beschriebenen Verfahren durchgeführt.

15

6. Nachweis von Stärke phosphorylierender Aktivität des OK1 Proteins

Der Nachweis der Stärke phosphorylierenden Aktivität des A.t.-OK1 Proteins erfolgte nach dem unter Punkt 11, Allgemeine Methoden beschriebenen Verfahren. Dabei wurden jeweils 5 µg von nach Beispiel 5 hergestelltem, gereinigtem A.t.-OK1 Protein, 20 in einem Ansatz A mit 5 mg Stärke, isoliert aus einer *sex1-3* Mutante von *Arabidopsis thaliana* nach Beispiel 1 b) und in einem Ansatz B mit 5 mg Stärke, erhalten durch enzymatische Phosphorylierung nach Beispiel 1 c) in jeweils 500 µl Phosphorylierungspuffer enthaltend 0,05 mM radioaktiv (³³P) markiertes, randomisiertes ATP (insgesamt 1.130.00 cpm, ca. 0,55 µCi) für 30 Minuten bei 25 Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Als Kontrolle diente ein Ansatz C, welcher dem Ansatz B entsprach, jedoch kein OK1 Protein enthielt, ansonsten aber in gleicher Weise behandelt wurde, wie die Ansätze A und B. Für alle Ansätze (A, B, C) wurden jeweils zwei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt.

Mittels Verwendung eines Scintillationszählers wurden die Stärken aus den Ansätzen 30 A, B, und C auf das Vorliegen von radioaktiv markiertem Phosphat hin untersucht

(siehe Punkt 11 b), Allgemeine Methoden). Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 und in Fig. 3 dargestellt.

	Gemessene Radioaktivität [cpm]	
	Versuch 1	Versuch 2
Ansatz A (nicht-phosphorylierte Stärke + OK1)	42	47
Ansatz B (phosphorylierte Stärke + OK1)	7921	8226
Ansatz C (phosphorylierte Stärke ohne Protein)	56	53

Tabelle 1: Nachweis einer Stärke phosphorylierenden Aktivität des Ok1 Proteins

5

Aus den erhaltenen Ergebnissen ist erkennbar, dass das OK1 Protein keine Phosphatgruppen von ATP auf Stärke überträgt, wenn nicht-phosphorylierte-Stärke als Substrat angeboten wird, da der in cpm gemessene Anteil der durch ein OK1 Protein auf nicht-phosphorylierte-Stärke übertragenen Phosphatgruppen den Anteil

10 der radioaktiv markierten Phosphatgruppen in Ansatz C (Kontrolle) nicht übersteigt. Wird hingegen P-Stärke als Substrat angeboten, ist der in cpm gemessene Anteil an radioaktiven Phosphatgruppen, welcher von ATP auf P-Stärke übertragen wird, signifikant höher. Daraus ist ersichtlich, dass das OK1 Protein P-Stärke als Substrat benötigt und dass nicht-phosphorylierte-Stärke nicht als Substrat von dem OK1

15 Protein akzeptiert wird.

Wird der oben dargestellte Versuch mit spezifisch in gamma-Position mit ^{33}P markiertem ATP durchgeführt, so kann kein Einbau von radioaktiv markiertem Phosphat in die Stärke festgestellt werden. Daraus ergibt sich, dass der beta-Phosphatrest des ATP von einem OK1 Protein auf Stärke übertragen wird. Die

20 Ergebnisse eines solchen Versuches sind in Fig. 6 dargestellt.

7. Nachweis der Autophosphorylierung

Der Nachweis der Autophosphorylierung des A.t.-OK1 Proteins erfolgte mittels der weiter oben beschriebenen Methode (siehe Punkt 12, Allgemeine Methoden). Dabei wurden 50 µg gereinigtes A.t.-OK1 Protein mit radioaktiv markiertem, randomisiertem

5 ATP in 220 µl Phosphorylierungspuffer (siehe oben, Punkt 12 d), Allgemeine Methoden) bei Raumtemperatur für 60 Minuten unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden den Inkubationsansätzen jeweils 100 µl entnommen und in vier frische Reaktionsgefäße überführt. In Reaktionsgefäß 1 wurde die Reaktion durch Zugabe von je 40 µl 0,11M EDTA gestoppt. Reaktionsgefäß 2 wurde bei 95°C für 5

10 Minuten inkubiert. Zu Reaktionsgefäß 3 wurde HCl bis zu einer Endkonzentration von 0,5 M zugegeben und zu Reaktionsgefäß 4 wurde NaOH bis zu einer Endkonzentration von 0,5 M zugegeben. Die Reaktionsgefäße 3 und 4 wurden jeweils für 25 Minuten bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden jeweils 50 µl der Reaktionsgefäße 1, 2, 3 und 4 entnommen, mit SDS Probenpuffer versetzt und

15 mittels SDS-Acrylamidgelelektrophorese (7,5%iges Acrylamidgel) aufgetrennt. Dazu wurden Proben der Reaktionsgefäße auf jeweils zwei identische Acrylamidgele aufgetragen. Eines der nach erfolgter Elektrophorese erhaltenen Gele wurde einer Autoradiographie unterzogen, während das zweite Gel mit Comassie Blau gefärbt wurde.

20 In dem mit Comassie Blau gefärbten Gel (siehe Fig. 2A)) ist deutlich zu erkennen, dass die Behandlung mit 0,5 M NaOH zu einem Abbau des OK1 Proteins führt. Das OK1 Protein ist daher als labil gegenüber NaOH zu bezeichnen. Inkubation bei 30°C, 95°C und mit 0,5 M HCl zeigen, dass das OK1 Protein unter den genannten Inkubationsbedingungen relativ stabil ist. Dieses ist daraus zu schließen, dass bei

25 diesen Inkubationsbedingungen jeweils etwa gleiche Mengen OK1 Protein nach Comassie Blau Färbung im betreffenden Gel nachgewiesen werden können.

In der Autoradiographie (siehe Abb. 2B)) ist durch Vergleich mit bei 30°C inkubiertem phosphoryliertem OK1 Protein zu erkennen, dass eine Inkubation des phosphorylierten OK1 Proteins bei 95°C zu einer deutlichen Reduzierung des

30 Phosphates, welches an das OK1 Protein gebunden ist, führt. Die Bindung zwischen dem Phosphatrest und einer Aminosäure des OK1 Proteins ist daher als Hitzelabil zu bezeichnen. Weiterhin ist eine leichte Abnahme des an das OK1 Protein

gebundenen Phosphates ebenfalls bei Inkubation mit 0,5 M HCl und 0,5 M NaOH im Vergleich mit bei 30°C inkubiertem phosphoryliertem OK1 Protein zu beobachten.

Wird die Tatsche berücksichtigt, dass die Menge des OK1 Proteins in der Autoradiographie nach Behandlung mit 0,5 M NaOH wegen der Labilität des OK1

5 Proteins gegenüber NaOH wesentlich geringer ist, als in den mit Hitze und Säure behandelten Proben, so kann geschlossen werden, dass die Bindung zwischen dem Phosphatrest und einer Aminosäure des OK1 Proteins relativ stabil gegenüber Basen ist. Da die mit Säure behandelte Probe etwa gleiche Proteinmengen wie die bei 30°C und bei 95°C inkubierte Probe enthält, jedoch ein signifikant geringeres
10 Signal als die mit 30°C behandelte Probe in der Autoradiographie aufweist, ist davon auszugehen, dass auch saure Inkubationsbedingungen die Bindung zwischen einem Phosphatrest und einer Aminosäure des OK1 Proteins zu einem gewissen Maße spalten. Daher konnte in den durchgeführten Versuchen auch eine Labilität der Bindung zwischen einem Phosphatrest und einer Aminosäure des OK1 Proteins
15 festgestellt werden. Die Labilität gegenüber Säuren ist dabei jedoch wesentlich weniger ausgeprägt als die Labilität gegenüber Hitze.

Bindungen zwischen der Aminosäure Histidin und Phosphat sind Hitzelabil, Säureabil aber Basestabil (Rosenberg, 1996, Protein Analysis and Purification, Birkhäuser, Boston, 242-244). Die oben beschriebenen Ergebnisse sind daher ein

20 Hinweis darauf, dass durch Autophosphorylierung eines OK1 Proteins ein Phosphohistidin entsteht.

Wird rekombinant exprimierte OK1 Protein wie oben beschrieben mit spezifisch in gamma-Position mit 33P markiertem ATP inkubiert, so kann keine Autophosphorylierung festgestellt werden. Fig. 5 A) zeigt die Menge an Protein, die

25 nach den betreffenden Inkubationsschritten mittels Western Blot Analyse in dem jeweiligen Reaktionsansatz noch nachgewiesen werden kann. Fig. 5 B) zeigt eine Autoradiographie von Protein aus den einzelnen Reaktionsansätzen. Es ist zu erkennen, dass bei Verwendung von spezifisch in der gamma-Position markiertem ATP keine Autophosphorylierung des OK1 Proteins auftritt, während bei Verwendung
30 von randomisiertem ATP eine Autophosphorylierung nachgewiesen werden kann.

Dieses bedeutet, dass bei der Autophosphorylierung eines OK1 Proteins der

Phosphatrest der beta-Position des ATP kovalent an eine Aminosäure des OK1 Proteins gebunden wird.

8. Nachweis der von einem OK 1 Protein phosphorylierten C-Atom-Positionen der Glucosemoleküle von Stärke

a) Herstellung von phosphorylierter-Stärke

Phosphorylierte Stärke wurde nach Punkt 7, Allgemeine Methoden hergestellt. Es wurden dazu in einem Ansatz A 5 mg nicht phosphorylierte Stärke, isoliert aus Blättern einer *sex1-3* Mutante von *Arabidopsis thaliana* mit 25 µg gereinigtem A.t.-

OK1 Protein und in einem zweiten Ansatz B 5 mg *in vitro* phosphorylierter-Stärke ursprünglich isoliert aus Blättern einer *sex1-3* Mutante von *Arabidopsis thaliana*) mit 5 µg gereinigtem R1 Protein eingesetzt. Die Reaktion erfolgte jeweils in 500 µl Phosphorylierungspuffer, der jeweils ^{33}P markiertes ATP (ca. $2,5 \times 10^6$ cpm) enthielt, durch Inkubation bei Raumtemperatur für 1 Stunde unter Schütteln. Zusätzlich wurde ein Kontrollansatz, welcher 5 mg Stärke, isoliert aus Blättern einer *sex1-3* Mutante von *Arabidopsis thaliana* und den genannten Phosphorylierungspuffer, jedoch kein Protein enthielt, verwendet. Der Kontrollansatz wurde genauso behandelt, wie die Ansätze A und B. Die einzelnen Reaktionen wurden durch Zugabe von jeweils 125 µl 10% SDS gestoppt und mit je 900 µl einmal mit 2% SDS, fünfmal mit 2 mM ATP und zweimal mit H₂O gewaschen. Nach jedem Waschschritt erfolgte eine Zentrifugation (jeweils 2 Minuten in einer Eppendorf Tischzentrifuge bei 13.000 rpm). Die erhaltenen Stärkepellets wurden jeweils in 1 ml H₂O resuspendiert und 100 µl jedes Ansatzes wurden nach Zugabe von 3 ml Scintillationscocktail (Ready SafeTM, BECKMANN) versetzt und anschließend mit Hilfe eines Scintillationszählers (LS 6500 Multi-Purpose Scintillation Counter, BECKMANN COULTERTM) vermessen.

Die Messung ergab folgende Ergebnisse:

Kontrolle:	63 cpm/100 µL	630 cpm/1000 µl
Ansatz A (OK1):	1351 cpm/100 µl	13512 cpm/1000 µl
Ansatz B (R1):	3853 cpm/100 µl	38526 cpm/1000 µl

30

b) Totalhydrolyse der P-Stärke

Die nach Schritt a) erhaltenen Suspensionen der Ansätze A, B und C wurden erneut zentrifugiert (5 Minuten in einer Eppendorf Tischzentrifuge bei 13.000 rpm), die erhaltenen Pellets in 90 µl 0,7 M HCl (Baker, zur Analyse) resuspendiert und anschließend für 2 Stunde bei 95°C inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze A, B

5 und C erneut zentrifugiert (5 Minuten in einer Eppendorf Tischzentrifuge bei 13.000 rpm), und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Sedimentierte Rückstände der Ansätze wurden in jeweils 100 µl H₂O resuspendiert und nach Zugabe von je 3 ml Scintillationscocktail (Ready SafeTM, BECKMANN) mit Hilfe eines Scintillationszählers (LS 6500 Multi-Purpose Scintillation Counter, BECKMANN 10 COULTERTM) vermessen. In keinem der Rückstände konnten signifikante Mengen an Radioaktivität nachgewiesen werden, was bedeutet, dass sich alle mit radioaktivem Phosphat markierten Hydrolyseprodukte im Überstand befinden.

Danach erfolgte die Neutralisation der einzelnen Überstände, enthaltend die Hydrolyseprodukte, durch Zugabe von jeweils 30 µl 2 M NaOH (die Menge der zur 15 Neutralisation benötigten Menge von NaOH wurde vorher an Blindproben ausgetestet): Die neutralisierten Hydrolyseprodukte wurden auf einen 10 kDa Microcon-Filter, der vorher zweimal mit je 200 µl H₂O gespült wurde, gegeben und für ca. 25 Minuten bei 12.000 rpm in einer Eppendorf Tischzentrifuge zentrifugiert. Von dem erhaltenen Filtrat (jeweils ca. 120 µl) wurden je 10 µl abgenommen, die 20 nach Zugabe von je 3 ml Scintillationscocktail (Ready SafeTM, BECKMANN) mit Hilfe eines Scintillationszählers (LS 6500 Multi-Purpose Scintillation Counter, BECKMANN COULTERTM) vermessen wurden. Die Bestimmung der in den einzelnen Ansätzen vorliegenden Aktivität ergab dabei folgende Ergebnisse:

	Ansatz A (OK1):	934 cpm/10 µl	11.208 cpm/120 µl	93 cpm/µl
25	Ansatz B (R1):	2518 cpm/10 µl	30.216 cpm/120 µl	252 cpm/µl

c) Auftrennung der Hydrolyseprodukte

Die Auftrennung der nach Schritt b) erhaltenen Hydrolyseprodukte wurde mittels HPAE unter Verwendung einer Dionex Anlage unter den oben angegebenen 30 Bedingungen (siehe (Allgemeine Methoden Punkt 13 c)) durchgeführt.. Die Proben zur Auftrennung der filtrierten Überstände der Ansätze A und B, erhalten nach Schritt b) waren dazu wie folgt zusammengesetzt:

Ansatz A (OK1): 43 µl des nach Schritt b) erhaltenen Überstand des Ansatzes A (entspricht ca. 4.000 cpm), 32 µl H₂O, 2,5 µl 2,5 mM Glucose-6-Phosphat und 2,5 µl 5 mM Glucose-3-Phosphat (Σ Volumen = 80 µl).

Ansatz B (R1): 16 µl des nach Schritt b) erhaltenen Überstand des Ansatzes B

5 (entspricht ca. 4.000 cpm), 59 µl H₂O, 2,5 µl 2,5 mM Glucose-6-Phosphat und 2,5 µl 5 mM Glucose-3-Phosphat (Σ Volumen = 80 µl).

Jeweils 60 µl, enthaltend ca. 3.000 cpm, der entsprechenden Proben wurden zur Auf trennung mittels HPAE injiziert. Die Durchführung der HPAE erfolgte nach den unter Punkt 23 c) angegebenen Bedingungen. Die Elutionspuffer wurden nach

10 Passage der HPAE-Säule in Fraktionen von je 1 ml aufgesammelt. Das Aufsammeln der Fraktionen wurde 10 Minuten nach Injektion der Probe begonnen. Anhand des erhaltenen Signals des eingesetzten PAD Detektors konnte die Elution von Glucose-6-Phosphat der Fraktion 15 und die die Elution von Glucose-3-Phosphat der Fraktion 17 zugeordnet werden. Jeweils 500 µl der einzelnen Fraktionen wurden mit je 3 ml

15 Scintillationscocktail (Ready SafeTM, BECKMANN) gemischt und anschließend mit Hilfe eines Scintillationszählers (LS 6500 Multi-Purpose Scintillation Counter, BECKMANN COULTERTM) vermessen. Für die einzelnen Fraktionen wurden folgende Meßwerte erhalten:

	Gesamt cpm je Fraktion		
	Ansatz (OK1)	AAnsatz (R1)	B
Fr 13	8,7	3,3	
Fr 14	13,1	32,2	
Fr 15 (G6P)	207,3	1952,8	
Fr 16	399,8	112,3	
Fr 17 (G3P)	1749,2	801,6	
Fr 18	196,7	17,3	
Fr 19	6,7	18,9	
Summe	2581,5	2938,3	
Auftrag	3000,0	3000,0	
Wiederfindung	86,0%	97,9%	

Tabelle 4: Gemessene Menge an Radiaktivität [cpm] in einzelnen Fraktionen von Hydrolyseprodukten, erhalten durch Hydrolyse von mittels eines OK1 Proteins oder R1 Proteins phosphorylierten Stärke.

Die Ergebnisse sind auch in Fig. 5 graphisch dargestellt

5

Nach von R1 Protein katalysierter Phosphorylierung von Stärke eluierten nach Hydrolyse der Stärke ca. 66% des radioaktiv markierten Phosphates, bezogen auf das gesamte gemessene radioaktive Phosphat in den analysierten Fraktionen, mit der Fraktion, die Glucose-6-Phosphat als Standard enthielt und ca. 27% mit der 10 Fraktion, die Glucose-3-Phosphat als Standard enthielt. Nach von OK1 Protein katalysierter Phosphorylierung von Stärke, eluierten nach Hydrolyse der Stärke ca. 67% des radioaktiv markierten Phosphates, bezogen auf das gesamte gemessene radioaktive Phosphat in den analysierten Fraktionen, mit der Fraktion, die Glucose-3-Phosphat als Standard enthielt und ca. 8% mit der Fraktion, die Glucose-6-Phosphat 15 als Standard enthielt.. Daraus kann geschlossen werden, dass Glucosemoleküle der Stärke von R1 Proteinen bevorzugt in C-6-Position phosphoryliert werden, während von OK1 Proteinen Glucosemoleküle der Stärke bevorzugt in C-3-Position phosphoryliert werden.

9. Identifizierung eines OK1 Proteins in Reis

Durch Verwendung der unter den Punkten 1 bis 13, Allgemeine Methoden beschriebenen Verfahren konnte auch ein Protein aus *Oryza sativa* (Varietät M202) identifiziert werden, welches einen Phosphatrest von ATP auf P-Stärke überträgt.

5 Das Protein wurde mit O.s.-OK1 bezeichnet. Nicht-phosphorylierte-Stärke wird von dem O.s.-OK1 Protein nicht als Substrat verwendet, d.h. auch das O.s.-OK1 Protein benötigt P-Stärke als Substrat. Die das identifizierte O.s.-OK1 Protein codierende Nucleinsäuresequenz ist unter SEQ ID NO 3 und die das O.s.-OK1 Protein codierende Aminosäuresequenz ist unter SEQ ID NO. 4 dargestellt. Die unter SEQ 10 ID NO 4 dargestellte Aminosäuresequenz codierend das O.s.-OK1 Protein weist eine Identität von 57% mit der unter SEQ ID NO 2 dargestellten Aminosäuresequenz codierend das A.t.-OK1 Protein auf. Die unter SEQ ID NO 3 dargestellte Nucleinsäuresequenz codierend das O.s.-OK1 Protein weist eine Identität von 61% mit der unter SEQ ID NO 1 dargestellten Nucleinsäuresequenz, codierend das A.t.- 15 OK1 Protein auf.

Herstellung des Plasmides pMI50 enthaltend die Nucleinsäuresequenz codierend ein OK1 Protein aus *Oryza sativa*

Der Vektor pMI50 enthält ein DNA-Fragment welches das vollständige OK1 Protein 20 aus Reis der Varietät M202 kodiert.

Die Amplifikation der DNA aus Reis erfolgte in fünf Teilschritten.

1. Der Teil des offenen Leserasters von Position -11 bis Position 288 der unter SEQ DIE NO 3 angegebenen Sequenz wurde mit Hilfe von Reverser Transkriptase und der Polymerase Kettenreaktion unter Verwendung der 25 synthetischen Oligonukleotide Os_ok1-R9 (GGAACCGATAATGCCTACATGCTC) und Os_ok1-F6 (AAAACTCGAGGAGGATCAATGACGTCGCTGCGGCCCTC) als Primer auf RNA von unreifen Reissamen amplifiziert. Das amplifizierte DNA-Fragment wurde in den Vektor pCR2.1 (Invitrogen Katalognummer K2020-20) kloniert. Das erhaltene Plasmid wurde mit pML123 bezeichnet.
- 30 2. Der Teil des offenen Leserasters von Position 250 bis Position 949 der unter SEQ DIE NO 3 angegebenen Sequenz wurde mit Hilfe von Reverser

Transkriptase und der Polymerase Kettenreaktion unter Verwendung der synthetischen Oligonukleotide Os_ok1-F4 (CCAGGTTAACGTTGGTGAGCA) und Os_ok1-R6 (CAAAGCACGATATCTGACCTGT) als Primer auf RNA von unreifen Reissamen amplifiziert. Das amplifizierte DNA-Fragment wurde in den Vektor 5 pCR2.1 (Invitrogen Katalognummer K2020-20) kloniert. Das erhaltene Plasmid wurde mit pML120 bezeichnet.

3. Der Teil des offenen Leserasters von Position 839 bis Position 1761 der unter SEQ DIE NO 3 angegebenen Sequenz wurde mit Hilfe von Reverser Transkriptase und der Polymerase Kettenreaktion unter Verwendung der synthetischen Oligonukleotide Os_ok1-F7 (TTGTTCGCGGGATATTGTCAGA) und Os_ok1-R7 (GACAAGGGCATCAAGAGTAGTATC) als Primer auf RNA von unreifen Reissamen amplifiziert. Das amplifizierte DNA-Fragment wurde in den Vektor 10 pCR2.1 (Invitrogen Katalognummer K2020-20) kloniert. Das erhaltene Plasmid wurde mit pML121 bezeichnet.
- 15 4. Der Teil des offenen Leserasters von Position 1571 bis Position 3241 der unter SEQ DIE NO 3 angegebenen Sequenz wurde mit Hilfe von Reverser Transkriptase und der Polymerase Kettenreaktion unter Verwendung der synthetischen Oligonukleotide Os_ok1-F8 (ATGATGCGCCTGATAATGCT) und Os_ok1-R4 (GGCAAACAGTATGAAGCACGA) als Primer auf RNA von unreifen 20 Reissamen amplifiziert. Das amplifizierte DNA-Fragment wurde in den Vektor pCR2.1 (Invitrogen Katalognummer K2020-20) kloniert. Das erhaltene Plasmid wurde mit pML119 bezeichnet.
- 25 5. Der Teil des offenen Leserasters von Position 2777 bis Position 3621 wurde mit Hilfe der Polymerase Kettenreaktion unter Verwendung der synthetischen Oligonukleotide Os_ok1-F3 (CATTGGATCAATGGAGGATG) und Os_ok1-R2 (CTATGGCTGTGGCCTGCTTGCA) als Primer auf genomischer DNA von Reis amplifiziert. Das amplifizierte DNA-Fragment wurde in den Vektor pCR2.1 (Invitrogen Katalognummer K2020-20) kloniert. Das erhaltene Plasmid wurde mit pML122 bezeichnet.
- 30 6. Die Zusammenklonierung der Teilstücke des offenen Leserasters von OK1 erfolgte folgendermaßen.

Ein 700 Basenpaare langes Apal-Fragment aus pML120, einen Teil des offenen Leserasters von OK1 enthaltend wurde in die Apal-Schnittstelle von pML121 kloniert. Das erhaltene Plasmid wurde mit pMI47 bezeichnet.

Ein 960 Basenpaare langes Fragement enthaltend die für OK1 codierenden Bereiche der Vektoren aus pML120 und pML123 wurde mittels Polymerase Kettenreaktion amplifiziert. Dabei wurden die Primer Os_ok1-F4 (s. o.) und Os_ok1-R9 (s. o.) je in einer Konzentration von 50 nm und die Primer Os_ok1-F6 und Os_ok1-R6 je in einer Konzentration von 500 nm eingesetzt. Das amplifizierte DNA-Fragment wurde in den Vektor pCR2.1 (Invitrogen Katalognummer K2020-20) kloniert. Das erhaltene Plasmid wurde mit pMI44 bezeichnet.

Ein 845 Basenpaare langes Fragment aus pML122 wurde zur Einführung einer Xhol-Schnittstelle nach dem Stop-Codon mit den Primern Os_ok1-F3 (s. o.) und Os_ok1-R2Xho (AAAACCTCGAGCTATGGCTGTGGCCTGCTTGCA) reamplifiziert und in den Vektor pCR2.1 (Invitrogen Katalognummer K2020-20) kloniert. Das erhaltene Plasmid wurde mit t pMI45 bezeichnet.

Ein 1671 Basenpaare langes Fragment enthaltend einen Teil des offenen Leserasters von OK1 wurde aus pML119 durch Verdau mit den Restriktionsenzymen *Spel* und *PstI* erhalten. Das Fragment wurde in pBluscript II SK+ (Genbank Acc.: X52328) kloniert. Das erhaltene Plasmid wurde mit pMI46 bezeichnet.

Ein 1706 Basenpaare langes Fragment enthaltend einen Teil des offenen Leserasters von OK1 wurde mit den Restriktionsenzymen *Spel* und *Xhol* aus pMI46 herausgeschnitten und in den Vektor pMI45 kloniert, der mit denselben Restriktionsenzymen geschnitten worden war. Das erhaltene Plasmid wurde mit pMI47 bezeichnet.

Ein 146 Basenpaare langes Fragment enthaltend einen Teil des offenen Leserasters von OK1 wurde mit den Restriktionsenzymen *AfII/NotI* aus pMI43 herausgeschnitten und in den Vektor pMI44 kloniert, der mit denselben Restriktionsenzymen geschnitten worden war. Das erhaltene Plasmid wurde mit pMI49 bezeichnet.

Ein 1657 Basenpaare langes Fragment enthaltend einen Teil des offenen Leserasters von OK1 wurde mit den Restriktionsenzymen *NotI* und *NarI* aus dem

Vektor pMI49 herausgeschnitten und in den Vektor pMI47 kloniert, der mit denselben Restriktionsenzymen geschnitten worden war. Das erhaltene Plasmid wurde mit pMI50 bezeichnet und enthält die gesamte codierende Region des in Reis identifizierten OK1 Proteins.

5

10. Herstellung eines Antikörpers, der ein OK1 Protein spezifisch erkennt

Als Antigen wurde ca. 100 µg gereinigtes A.t.-OK1 Protein mittels SDS Gelelektrophorese aufgetrennt, die Proteinbande enthaltend das A.t.-OK1 Protein ausgeschnitten und an die Firma EUROGENTEC S.A. (Belgien) verschickt, die die

10 Herstellung des Antikörpers im Auftrag ausführte. Zunächst wurden die Preimmunseren von Kaninchen dahingehend geprüft, ob sie evtl. bereits vor der Immunisierung mit rekombinantem OK1 ein Protein aus einem A. t. Gesamtextrakt erkennen. Die Preimmunseren zweier Kaninchen erkannten im Bereich 100-150 kDa keine Proteine und wurden daraufhin für die Immunisierung ausgewählt. Pro
15 Kaninchen wurden 4 Injektionen à 100 µg Protein durchgeführt (Tag 0, 14, 28, 56). Je Kaninchen wurden 4 Blutentnahmen durchgeführt: (Tag 38, Tag 66, Tag 87 und die Endblutung). Serum, erhalten nach der ersten Blutung zeigte bereits eine spezifische Reaktion mit OK1 Antigen im Western-Blot. Für alle weiteren Versuche wurde jedoch die letzte Blutung eines Kaninchens verwendet.

20

11. Herstellung transgener Maispflanzen, die eine erhöhte Aktivität eines OK1 Proteins und eines R1 Proteins aufweisen

a) Herstellung eines Konstruktes zur Transformation von Maispflanzen, die ein R1 Protein überexprimieren
25 Als Ausgangsplasmid zur Herstellung eines Plasmides, welches zur Transformation von Maispflanzen verwendet wurde, diente das Plasmid pMZ12. Diese Plasmid enthält den *ColE1* Origin des Plasmides pBR322 (Bolivar et al, 1977, Gene 2, 95-113) und einen bakteriellen Selektionsmarker, der eine Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Gentamycin vermittelt (Wohlleben et al., 1989, MGG 217, 202-208).
30 Weiterhin enthält dieses Plasmid eine rechte und eine linke T-DNA Border Sequenz.

Zwischen diesen T-DNA Border Sequenzen enthält das Plasmid ein *bar* Gen aus *Streptomyces hygroscopicus* (White et al., 1990, NAR 18, 1062; EMBL Acc.: X17220), welches Resistenz gegenüber dem Herbizid Glufosinat vermittelt. Die Expression des *bar* Gens wird durch den Promotor des *actin* gens aus Reis (McElroy et al., 1990, Plant Cell 2, 163.171) initiiert. Zur Stabilisierung der Expression des *bar* Gens ist zwischen dem *actin* Promotor und der das *bar* Protein codierenden Sequenz das 1. Intron des *actin* Gens aus Reis (McElroy et al., 1990, Plant Cell 2, 163.171) eingefügt. Nach der das *bar* Protein codierenden Sequenz folgt das Polyadenylierungssignal des Nopalinsynthase Gens aus *Agrobacterium tumefaciens* (Depicker et al., 1982, J Mol. Appl. Gent. 1, 561-573).

In das Plasmid pMZ12 wurde der Ubiquitinpromotor aus *Zea mays* (Christensen et al. 1992, Plant Mol. Bio 18, 675-689), gefolgt vom 1. Intron des Ubiquitin Gens aus *Zea mays* (Christensen et al. 1992, Plant Mol. Bio 18, 675-689), gefolgt von der codierenden Sequenz des R1 Gens aus *Solanum tuberosum* (siehe SEQ ID NO 10), gefolgt von dem Polyadenylierungssignal des Nopalinsynthase Gens aus *Agrobacterium tumefaciens* (Depicker et al., 1982, J Mol. Appl. Gent. 1, 561-573) zwischen die linke und rechte T-DNA Border Sequenz eingefügt. Das erhaltene Plasmid wurde mit pHN3-146 bezeichnet.

20 b) Transformation von Maispflanzen mit dem Plasmid pHN3-146

Zehn Tage nach Pollination wurden unreife Embryonen von Maispflanzen isoliert und mit Hilfe von *Agrobacterium tumefaciens*, enthaltend das Plasmid pHN3-146 als Cointegrat, nach der bei Ishida et al. (1996, Nature Biotechnology 14, 745-750) beschriebenen Methode transformiert. Aus dieser Transformation hervorgegangene 25 so genannte T0 Pflanzen wurden im Gewächshaus angezogen.

c) Identifizierung von Maispflanzen, die eine erhöhte Expression des S.t.-R1 Proteins aus *Solanum tuberosum* aufweisen

Es konnten mittels Quantitativer RT PCR Analyse Pflanzen identifiziert werden, die 30 eine Expression von mRNA, codierend das S.t.-R1 Protein, aufwiesen.

d) Herstellung des Plasmides pUbi-A.t.-OK1

Zunächst wurde das Plasmid pIR96 hergestellt. Das Plasmid pIR96 wurde erhalten, indem ein synthetisches Stück DNA bestehend aus den beiden Oligonukleotiden X1 (TGCAGGCTGCAGAGCTCCTAGGCTCGAGTTAACACTAGTAAGCTTAATTAAGAT ATCATTAC) und X2

5 (AATTGTAAATGATATCTTAATTAAGCTTACTAGTGTTAACTCGAGCCTAGGAGCT
CTGCAGCCTGCA) in den mit *Sdai* und *MunI* geschnittenen Vektor pGSV71 kloniert wurde. Das erhaltene Plasmid wurde mit *Sdai* geschnitten und die überstehenden 3'-Enden mit T4 DNA Polymerase geglättet. Das erhaltene Plasmid wurde mit *Sdai* geschnitten, die überstehenden 3'-Enden mit T4 DNA Polymerase geglättet und ein
10 197 Basenpaare großes, mittels T4 DNA-Polymerase geglättetes HindIII / *SphI* Fragment aus pBinAR (Höfgen und Willmitzer, 1990, Plant Science 66, 221-230), enthaltend das Terminationssignal des Octopinsynthase Gens aus *Agrobacterium tumefaciens*, eingefügt. Das erhaltene Plasmid wurde mit pIR96 bezeichnet.
pGSV71 ist ein Derivat des Plasmides pGSV7, welches sich vom intermediären
15 Vektor pGSV1 ableitet. pGSV1 stellt ein Derivat von pGSC1700 dar, dessen Konstruktion von Cornelissen und Vanderwiele (Nucleic Acid Research 17, (1989), 19-25) beschrieben wurde. pGSV1 wurde aus pGSC1700 erhalten, durch Deletion des Carbenicillin Resistenzgens, sowie Deletion der T-DNA-Sequenzen der TL-DNA-Region des Plasmides pTiB6S3.
20 pGSV7 enthält den Replikationsursprung des Plasmides pBR322 (Bolivar et al., Gene 2, (1977), 95-113) sowie den Replikationsursprung des Pseudomonas-Plasmides pVS1 (Itoh et al., Plasmid 11, (1984), 206). pGSV7 enthält außerdem das selektierbare Markergen *aadA*, aus dem Transposon Tn1331 aus *Klebsiella pneumoniae*, welches Resistenz gegenüber den Antibiotika Spectinomycin und
25 Streptomycin verleiht (Tolmasky, Plasmid 24 (3), (1990), 218-226; Tolmasky and Crosa, Plasmid 29(1), (1993), 31-40)

Das Plasmid pGSV71 wurde erhalten durch Klonierung eines chimären bar-Gens zwischen die Borderregionen von pGSV7. Das chimäre bar-Gen enthält die Promotorsequenz des Blumenkohlmosaikvirus zur Initiation der Transkription (Odell et al., Nature 313, (1985), 180), das bar-Gen aus *Streptomyces hygroscopicus* (Thompson et al., 1987, EMBO J. 6, 2519-2523) und den 3'-untranslatierten Bereich des Nopalinsynthasegens der T-DNA von pTiT37, zur Termination der Transkription

und Polyadenylierung. Das bar-Gen vermittelt Toleranz gegenüber dem Herbizid Glufosinat-Ammonium.

Ein 1986 Basenpaare langes Fragment enthaltend den Promoter des Polyubiquitin-Gens aus Mais (EMBLK Acc.: 94464, Christensen et al., 1992, Plant Mol. Biol. 18:

5 675-689) wurde als *PstI*-Fragment in pBluescript II SK+ kloniert. Das erhaltene Plasmid wurde mit pSK-ubq bezeichnet.

Das Plasmid A.t.-OK1-pGEM wurde mit dem Restriktionsenzymen *Bsp*120I geschnitten, mit T4-DNA-Polymerase die Enden geglättet und mit *SacI* nachgeschnitten. Das DNA-Fragment kodierend das OK1 Protein aus *Arabidopsis* 10 *thaliana* wurde in das Plasmid pSK-ubq kloniert, welches mit *SmaI* und *SacI* geschnitten war. Das erhaltene Plasmid wurde mit pSK-ubq-ok1 bezeichnet.

Aus dem Plasmid pSK-ubq-ok1 wurde ein Fragment isoliert, welches den Ubiquitin-Promoter aus Mais und das vollständige offene Leseraster für das A.t.-OK1 Protein aus *Arabidopsis thaliana* enthielt. Dazu wurde das Plasmid mit dem 15 Restriktionsenzym *Asp*718I geschnitten, die Enden mit T4 DNA Polymerase aufgefüllt und mit *SdI* nachgeschnitten. Das erhaltene, 5799 Basenpaare große Fragment wurde in das mit *Eco*RV und *PstI* geschnittene Plasmid pIR96 kloniert. Das aus dieser Klonierung erhaltene Plasmid wurde mit pUbi-A.t.-OK1 bezeichnet.

20 e) Transformation von Maispflanzen mit dem Plasmid pUbi-A.t.-OK1

Zehn Tage nach Pollination wurden unreife Embryonen von Maispflanzen isoliert und mit Hilfe von *Agrobacterium tumefaciens*, enthaltend das Plasmid pUbi-A.t.-OK1 als Cointegrat, nach der bei Ishida et al. (1996, Nature Biotechnology 14, 745-750) beschriebenen Methode transformiert. Aus dieser Transformation hervorgegangene 25 so genannte T0 Pflanzen wurden im Gewächshaus angezogen.

f) Identifizierung von Maispflanzen, die eine erhöhte Expression des A.t.-OK1 Proteins aus *Arabidopsis thaliana* aufweisen

Es konnten mittels Quantitativer RT PCR Analyse Pflanzen identifiziert werden, die 30 eine Expression von mRNA, codierend das A.t.-OK1 Protein, aufwiesen.

g) Erzeugung von homozygoten Pflanzen, die eine erhöhte Expression des S.t.-R1 Proteins oder des A.t.-OK1 Proteins aufweisen

T1 Pflanzen, die eine Expression des S.t.-R1 Proteins oder des A.t.-OK1 Proteins aufwiesen, wurden Samen der einzelnen Pflanzen geerntet und jeweils ca. 30

5 Samen pro Pflanze erneut ausgelegt und im Gewächshaus kultiviert. Pflanzen dieser T1 Generation wurden im Dreiblattstadium mit einer Lösung, enthaltend 0,5% Basta® besprüht. Es wurden nur solche Gruppen von T1 Pflanzen weiterverfolgt, bei welchen ca. 25% der jeweils 30 kultivierten Pflanzen nach Sprühen mit der Basta® Lösung abstarben, da es sich bei diesen Pflanzen um solche handelt, bei welchen 10 die Integration der betreffenden T-DNA des Plasmides pHN3-146 oder pUbi-A.t.-OK1 an einem Locus im Genom vorliegt. Aus Blattmaterial von den ca. 75% der Pflanzen, die das Sprühen mit Basta® Lösung überlebten, wurde jeweils genomische DNA isoliert und mittels Invader® Technology (Pielberg et al. 2003, Genome Res.;13, 2171-2177) auf die jeweils vorliegende Kopienzahl hin untersucht. Bei T1 Pflanzen, 15 die innerhalb einer Gruppe von Nachkommen einer T0 Pflanze, bei der Analyse mittels Invader® Technologie ein etwa doppelt so starkes Signal ergaben, wie die restlichen Nachkommen der gleichen T0 Pflanze, sind homozygot bezüglich des Locus, an welchem die T-DNA des betreffenden Plasmides integriert ist. Weisen ca. 30% der Nachkommen einer T0 Pflanze, die die Behandlung mit Basta® Lösung 20 überlebt haben ein etwa doppelt so starkes Signal in der Analyse mittels Invader® Technologie auf, im Vergleich zu den restlichen ca.70% der Nachkommen der gleichen T0 Pflanze, so ist dieses ein weiterer Hinweis darauf, dass es sich um die Integration der T-DNA an einem einzigen Locus handelt.

25 h) Erzeugung von Pflanzen, die sowohl eine erhöhte Expression des S.t.-R1 Proteins, als auch eine erhöhte Expression des A.t.-OK1 Proteins aufweisen

T1 Pflanzen, die eine erhöhte Expression eines S.t.-R1 Proteins aufwiesen und die nach der unter g) beschriebenen Analyse homozygot bezüglich der Integration der T-

30 DNA des Plasmides pHN3-146 sind und in welchen die Integration an einem Locus im Genom der Pflanze vorliegt, wurden mit T1 Pflanzen, die eine erhöhte Expression eines A.t.-OK1 Proteins aufwiesen und nach der unter g) beschriebenen Analyse

homozygot bezüglich der Integration der T-DNA des Plasmides pUbi-A.t.-OK1 sind und in welchen die Integration an einem Locus im Genom der Pflanze vorliegt, gekreuzt. Die Nachkommen dieser Kreuzungen weisen sowohl eine erhöhte Expression des S.t.-R1 Proteins, als auch eine erhöhte Expression des A.t.-OK1

5 Proteins auf.

- i) Analyse der Körner von transgenen Maispflanzen und der von diesen synthetisierten Stärke

Aus den unter h) beschriebenen Kreuzungen hervorgegangenen Körnern der

10 betreffenden Mais Pflanzen wurde Stärke isoliert. Die Stärke aus Körnern, die eine erhöhte Expression des S.t.-R1 Proteins und eine erhöhte Expression des A.t.-OK1 Proteins aufwiesen, enthielt mehr kovalent an die Stärke gebundenes Phosphat, als Stärke, isoliert aus nicht transformierten Wildtyp-Pflanzen.

15 Stärke, isoliert aus Körnern, die eine erhöhte Expression des S.t.-R1 Proteins und eine erhöhte Expression des A.t.-OK1 Proteins aufwiesen, enthielt ebenfalls mehr kovalent an die Stärke gebundenes Phosphat, als Stärke, isoliert aus Pflanzen, die nur eine erhöhte Expression des S.t.-R1 Proteins oder nur eine erhöhte Expression des A.t.-OK1 Proteins aufwiesen.

20 12. Herstellung transgener Weizenpflanzen, die eine erhöhte Expression eines OK1 Proteins und eines R1 Proteins aufweisen

- a) Herstellung von transgenen Weizenpflanzen, die ein R1 Protein überexprimieren

Die Herstellung von Weizenpflanzen, welche eine erhöhte Expression des R1 Proteins von Kartoffel aufweisen, wurde in WO 02 34923 beschrieben. Die dort beschriebenen Pflanzen wurden teilweise als Ausgangsmaterial für die Herstellung von Pflanzen, die eine erhöhte Expression eines OK1 Proteins und eines R1 Proteins aufweisen, eingesetzt.

30 b) Herstellung eines Plasmides zur Transformation von Weizenpflanzen, die ein OK1 Protein überexprimieren

pMCS5 (Mobitec, www.mobitec.de) wurde mit *BglII* und *BamHI* verdaut und religiert.

Das erhaltene Plasmid wurde mit pML4 bezeichnet.

Der *nos*-Terminator aus *Agrobacterium tumefaciens* (Depicker et al., 1982, Journal of Molecular and Applied Genetics 1: 561-573) wurde mit den Primern P9

5 (ACTTCTgCAgCggCCgCgATCgTTCAACATTggCAATAAAGTTTC) und P10 (TCTAAgCTTggCgCCgCTAgCAgATCTgATCTAgTAACATAgATgACACC)

amplifiziert (25 Zyklen, 30 sec 94 °C, 30 sec 58 °C, 30 sec 72 °C), mit *HindIII* und *PstI* verdaut und in das mit den gleichen Enzymen geschnittene Plasmid pML4

10 kloniert. Das erhaltene Plasmid wurde mit pML4-nos bezeichnet. In diesen Vektor wurde ein 1986 Basenpaare langes Fragment enthaltend den Promoter des Polyubiquitin-Gens aus Mais (Genbank Acc.: 94464, Christensen et al., 1992, Plant Mol. Biol. 18: 675-689) und dem durch Verdau mit *ClaI* und Religation verkürzten ersten Intron desselben Gens kloniert. Das erhaltene Plasmid wurde mit pML8 bezeichnet.

15 In das Plasmid pML8 wurde das vollständige offene Leseraster von OK1 aus *Arabidopsis thaliana* kloniert. Dazu wurde das entsprechende Fragment mit *Bsp120/NotI* aus A.t.-OK1-pGEM herausgeschnitten und in sense Orientierung in die *NotI*-Schnittstelle von pML8 ligiert.

Aus dem erhaltenen Vektor pML8-A.t.-OK1 kann mit den Restriktionsenzymen *AvrII* 20 und *SwaI* ein Fragment für die Transformation von Weizenpflanzen herausgeschnitten werden, welches den Promoter des Polyubiquitin-Gens aus Mais, das vollständige offene Leseraster von OK1 aus *Arabidopsis thaliana* und den *nos*-Terminator aus *Agrobacterium tumefaciens* enthält.

25 c) Herstellung eines Plasmides zur Erzeugung von Weizenpflanzen, die ein R1 Protein überexprimieren

Es wurde ein Plasmid hergestellt indem das DNA-Fragment welches für das vollständige R1-Protein aus Kartoffel codiert, zwischen zwei Erkennungsschnittstellen für das Restriktionsenzym *PacI* liegt. Dazu wurde die

30 *Multiple Cloning Site* aus dem Plasmid pBluescript II SK+ mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion und den beiden Oligonukleotiden MCS1-1 (TTTTGCGCGCGTTAATTAAACGACTCACTATAGGGCGA) und MCS1-2

(TTTTGCGCGCTTAATTAAACCCACTAAAGGGAACAAAAG) amplifiziert, mit dem Restriktionsenzym *BssHII* nachgeschnitten und in den mit *BssHII* geschnittenen und dephosphorylierten Vektor pBluescript II SK+ (Invitrogen) kloniert. Das erhaltene Plasmid wurde mit pSK-Pac bezeichnet.

5 In den Vektor pSK-Pac wurde ein *NotI*-Fragment kloniert, welches aus dem Klon pRL2 (WO 9711188) erhalten wurde. Das *NotI* Fragment enthält das vollständige offene Leseraster für das R1-Protein aus Kartoffel. Das erhaltene Plasmid wurde mit pIR1 bezeichnet.

Aus pSK-ubq (siehe oben) wurde mit den Restriktionsenzymen *EcoRV* und *SmaI* ein

10 Fragment herausgeschnitten, welches den Ubiquitin-Promoter und das verkürzte erste Intron enthielt und in die *EcoRV*-Schnittstelle des Plasmids pIR96 kloniert. In das erhaltene Plasmid wurde in sense Orientierung zum Promoter ein *Pacl*-Fragment aus pIR1 kloniert, welches das vollständige offene Leseraster kodierend für das R1-Protein aus Kartoffel enthält. Das erhaltene Plasmid wurde mit pML82 bezeichnet.

15

d) Transformation von Weizenpflanzen zur Überexpression von einem OK1 Protein

Weizenpflanzen der Varietät Florida wurden mit aus einem Agarosegel ausgeschnittenen Fragment, welches mit den Restriktionsenzymen *AvrII* und *SwaI* 20 aus dem Plasmid pML8-A.t.-OK1 herausgeschnitten wurde und den Promoter des Polyubiquitin-Gens aus Mais, das vollständige offene Leseraster von OK1 aus *Arabidopsis thaliana* und den *nos*-Terminator aus *Agrobacterium tumefaciens* enthält, zusammen mit dem Plasmid pGSV71 mittels der biolistischen Methode nach der bei Becker et al. (1994, Plant Journal 5, 299-307) beschriebenen Methode 25 transformiert. Die erhaltenen Pflanzen wurden mit TA-OK1 bezeichnet.

e) Transformation von Weizenpflanzen zur Überexpression von einem R1 Protein
Weizenpflanzen der Varietät Florida wurden mit dem Plasmid pML82 mittels der biolistischen Methode nach der bei Becker et al. (1994, Plant Journal 5, 299-307) 30 beschriebenen Methode transformiert. Die erhaltenen Pflanzen wurden mit TA-R1 bezeichnet.

f) Cotransformation von Weizenpflanzen zur Überexpression eines OK1 Proteins und eines R1 Proteins

Weizenpflanzen der Varietät Florida wurden mit einem DNA Gemisch, enthaltend das Plasmid pML82 und ein mittels HPLC gereinigtes Fragment, welches mit den

5 Restriktionsenzymen *AvrII* und *Swal* aus dem Plasmid pML8-A.t.-OK1 herausgeschnitten wurde und den Promoter des Polyubiquitin-Gens aus Mais, das vollständige offene Leseraster von OK1 aus *Arabidopsis thaliana* und den nos-Terminator aus *Agrobacterium tumefaciens* enthält, mittels der biolistischen Methode nach der bei Becker et al. (1994, Plant Journal 5, 299-307) beschriebenen Methode 10 transformiert. Mit Hilfe von RT-PCR wurden Pflanzen identifiziert, die sowohl eine Expression des A.t.-Ok1 Proteins, als auch eine Expression des S.t.-R1 Proteins aufwiesen. Die erhaltenen Pflanzen wurden mit TA-R1-OK1 bezeichnet.

g) Identifizierung von transgenen Weizenpflanzen

15 T1 Pflanzen der Linien TA-R1 und TA-OK1 wurden im Gewächshaus kultiviert und vor der Blüte mit Basta[®] (0,5%ige Lösung) besprüht. Pflanzen, die das Basta[®] vermittelnde Resistenzgen nicht exprimieren starben ab.

h) Herstellung von Weizenpflanzen, die eine Expression eines S.t.-R1 Proteins

20 und eine Expression eines A.t.-OK1 Proteins aufweisen, mittels Kreuzung TA-OK1 Pflanzen, die die Behandlung mit Basta[®] überlebten, wurden entweder mit TA-R1 Pflanzen, die die Behandlung mit Basta[®] überlebten oder mit homozygoten Pflanzen der in WO 02 034923 beschriebenen Linie 40A-11-8 gekreuzt. Die erhaltenen Nachkommen wurden mit TA-Ok1xTA-R1 bzw. mit TA-OK1x40A-11-8 25 bezeichnet.

e) Analyse der transgenen Weizenpflanzen und der von diesen synthetisierten Stärke

Aus durch Kreuzungen der Linien TA-Ok1 und TA-R1 bzw. TA-OK1 und 40A-11-8 30 hervorgegangenen Körnern wurde Stärke isoliert und der Gehalt an kovalent an die Stärke gebundenem Phosphat bestimmt. Der Phosphatgehalt von Stärke, die aus Körnern, entstanden aus den Kreuzungen TA-Ok1 und TA-R1 bzw. TA-OK1 und

40A-11-8 isoliert wurde, war bei einigen Pflanzen deutlich höher, als bei Stärke, die aus Körnern von entsprechenden Wildtyp-Pflanzen oder aus Pflanzen der Linie 40A-11-8 isoliert wurde.

Für die Analyse der Stärke aus verschiedenen TA-R1-OK1 Linien wurden Körner der jeweiligen Pflanzen geerntet und der C-6-Phosphatgehalt und der C-3-Phosphatgehalt der isolierten Stärke analysiert. Es konnten einige Pflanzen identifiziert werden, bei welchen der Gehalt an C-6-Phosphat plus C-3-Phosphat deutlich erhöht war im Vergleich zu dem Gehalt an C-6-Phosphat plus C-3-Phosphat von Stärke, isoliert aus Körnern der Linien TA-R1 oder 40A-11-8.

10

13. Herstellung transgener Reispflanzen, die eine erhöhte Expression eines OK1 Proteins und eines R1 Proteins aufweisen

a) Herstellung des Plasmides pGlo-A.t.-OK1

Das Plasmid pIR94 wurde erhalten indem der Promoter des Globulin-Gens aus Reis durch eine Polymerase Kettenreaktion (30 x 20 sec 94 °C, 20 sec 62 °C, 1 min 68 °C, 4 mM Mg₂SO₄) mit den Primern glb1-F2 (AAAACAATTGGCGCCTGGAGGGAGGAGA) und glb1-R1 (AAAACAATTGATGATCAATCAGACAATCACTAGAA) auf genomischer DNA von Reis der Varietät M202 mit High Fidelity Taq Polymerase (Invitrogen, Katalognummer 11304-011) amplifiziert und in pCR2.1 (Invitrogen Katalognummer K2020-20) kloniert wurde.

Das Plasmid pIR115 wurde erhalten indem eine synthetisches Stück DNA bestehend aus den beiden Oligonukleotiden X1 (TGCAGGCTGCAGAGCTCCTAGGCTCGAGTTAACACTAGTAAGCTTAATTAAGAT 25 ATCATTAC) und X2 (AATTGTAAATGATATCTTAATTAAGCTTACTAGTGTAACTCGAGCCTAGGAGCTCTGCAGCCTGCA) in den mit *Sd*al und *Mu*nl geschnittenen Vektor pGSV71 kloniert wurde.

Das erhaltene Plasmid pIR115 wurde mit *Sd*al geschnitten, die überstehenden 3'-Enden mit T4 DNA Polymerase geglättet und ein 197 Basenpaare großes, mittels T4 DNA-Polymerase geglättetes *Hind*III / *Sph*I Fragment aus pBinAR (Höfgen und

Willmitzer, 1990, Plant Science 66, 221-230), enthaltend das Terminationssignal des Octopinsynthase Gens aus *Agrobacterium tumefaciens*, eingefügt. Das erhaltene Plasmid wurde mit pIR96 bezeichnet.

Das Plasmid pIR103 wurde erhalten, indem ein 986 Basenpaare langes DNA

5 Fragment aus pIR94, enthaltend den Promoter des Globulin-Gens aus Reis, kloniert in das Plasmid pIR96 kloniert wurde.

pGSV71 ist ein Derivat des Plasmides pGSV7, welches sich vom intermediären Vektor pGSV1 ableitet. pGSV1 stellt ein Derivat von pGSC1700 dar, dessen Konstruktion von Cornelissen und Vanderwiele (Nucleic Acid Research 17, (1989),

10 19-25) beschrieben wurde. pGSV1 wurde aus pGSC1700 erhalten, durch Deletion des Carbenicillin Resistenzgen, sowie Deletion der T-DNA-Sequenzen der TL-DNA-Region des Plasmides pTiB6S3.

pGSV7 enthält den Replikationsursprung des Plasmides pBR322 (Bolivar et al., Gene 2, (1977), 95-113) sowie den Replikationsursprung des *Pseudomonas*-

15 Plasmides pVS1 (Itoh et al., Plasmid 11, (1984), 206). pGSV7 enthält außerdem das selektierbare Markergen *aadA*, aus dem Transposon Tn1331 aus *Klebsiella pneumoniae*, welches Resistenz gegenüber den Antibiotika Spectinomycin und Streptomycin verleiht (Tolmasky, Plasmid 24 (3), (1990), 218-226; Tolmasky and Crosa, Plasmid 29(1), (1993), 31-40)

20 Das Plasmid pGSV71 wurde erhalten durch Klonierung eines chimären *bar*-Gens zwischen die Borderregionen von pGSV7. Das chimäre *bar*-Gen enthält die Promotorsequenz des Blumenkohlmosaikvirus zur Initiation der Transkription (Odell et al., Nature 313, (1985), 180), das *bar*-Gen aus *Streptomyces hygroscopicus* (Thompson et al., Embo J. 6, (1987), 2519-2523) und den 3'-untranslatierten Bereich 25 des Nopalinsynthasegens der T-DNA von pTiT37, zur Termination der Transkription und Polyadenylierung. Das *bar*-Gen vermittelt Toleranz gegenüber dem Herbizid Glufosinat-Ammonium.

Ein DNA-Fragment, welches die Sequenz des vollständigen offenen Leserasters des OK1 Proteins aus *Arabidopsis* enthält, wurde aus dem Vektor A.t.-OK1-pGEM 30 herausgeschnitten und in den Vektor pIR103 kloniert. Dazu wurde das Plasmid A.t.-OK1-pGEM mit dem Restriktionsenzymen *Bsp*120I geschnitten, mit T4-DNA-Polymerase die Enden geglättet und mit *Sall* nachgeschnitten. Das DNA-Fragment

kodierend das OK1 Protein aus *Arabidopsis thaliana* wurde in den mit *Ecl*136II und *Xhol* geschnittenen Vektor pIR103 kloniert. Das erhaltene Plamid wurde mit pGlo-A.t.-OK1 bezeichnet.

5 b) Transformation von Reispflanzen mit dem Plasmid pGlo-A.t.-OK1
Reispflanzen (Varietät M202) wurden mittels *Agrobacterium* (enthaltend das Plasmid pGlo-A.t.-OK1) unter Verwendung der bei Hiei et al. (1994, Plant Journal 6(2), 271-282) beschriebenen Methode transformiert.

10 c) Analyse der transgenen Reispflanzen, die mit dem Plasmid pGlo-A.t.-OK1 transformiert wurden
Es konnten mittels Quantitativer RT PCR Analyse Pflanzen identifiziert werden, die eine Expression von mRNA, codierend das A.t.-OK1 Protein, aufwiesen. Homozygote Pflanzen der T1 Generation wurden wie oben in Beispiel 11. g) anhand von Maispflanzen beschrieben, identifiziert. Die erhaltenen Pflanzen wurden mit OS-OK1 bezeichnet.

d) Transformation von Reispflanzen mit dem Plasmid pML82
Reispflanzen (Varietät M202) wurden mittels Agrobacterium (enthaltend das Plasmid pML82) unter Verwendung der bei Hiei et al. (1994, Plant Journal 6(2), 271-282) beschriebenen Methode transformiert.

20 e) Analyse der transgenen Reispflanzen, die mit dem Plasmid pGloML82 transformiert wurden
Es konnten mittels Quantitativer RT PCR Analyse Pflanzen identifiziert werden, die eine Expression von mRNA, codierend das S.t.-R1 Protein, aufwiesen. Homozygote Pflanzen der T1 Generation wurden wie oben in Beispiel 11. g) anhand von Maispflanzen beschrieben, identifiziert. Die erhaltenen Pflanzen wurden mit OS-R1 bezeichnet.

30 f) Herstellung von Reispflanzen, die eine Expression eines S.t.-R1 Proteins und eine Expression eines A.t.-OK1 Proteins aufweisen, mittels Kreuzung.

Homozygote OS-OK1 Pflanzen wurden entweder mit homozygoten OS-R1 Pflanzen, gekreuzt. Die erhaltenen Nachkommen wurden mit OS-Ok1xOS-R1 bezeichnet.

g) Analyse der transgenen Reispflanzen und der von diesen synthetisierten Stärke

5 Aus den durch Kreuzungen hervorgegangenen OS-Ok1xOS-R1 Körnern wurde Stärke isoliert und der Gehalt an kovalent an die Stärke gebundenem Phosphat bestimmt. Der Phosphatgehalt in C-6-Position und in C-3-Position der Glucosemoleküle von Stärke, die aus Körnern, entstanden aus den Kreuzungen der Linien OS-Ok1 und OS-R1 isoliert wurde, war bei einigen Linien deutlich höher, als

10 bei Stärke, die aus Körnern von entsprechenden Wildtyp-Pflanzen oder aus Pflanzen der Linien OS-R1 isoliert wurde.

Patentansprüche

EPO-BERLIN

05-03-2004

1. Genetisch modifizierte Pflanzenzelle, dadurch gekennzeichnet, dass sie eine erhöhte Aktivität mindestens eines OK1 Proteins und mindestens eines R1 Proteins im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen aufweist.
2. Genetisch modifizierte Pflanzenzelle nach Anspruch 1, wobei die genetische Modifikation in der Einführung mindestens eines fremden Nucleinsäuremoleküls, in das Genom der Pflanze besteht.
3. Genetisch modifizierte Pflanzenzelle nach Anspruch 2, wobei mindestens ein fremdes Nucleinsäuremolekül ein OK1 Protein codiert.
4. Genetisch modifizierte Pflanzenzelle nach Anspruch 2, wobei mindestens ein fremdes Nucleinsäuremolekül ein R1 Protein codiert.
5. Genetisch modifizierte Pflanzenzelle nach Anspruch 2, wobei ein erstes fremdes Nucleinsäuremolekül ein R1 Protein codiert und ein zweites fremdes Nucleinsäuremolekül ein OK1 Protein codiert.
6. Genetisch modifizierte Pflanzenzelle nach Anspruch 4 oder 5, wobei besagtes fremdes, ein R1 Protein codierendes, Nucleinsäuremolekül ein R1 Protein aus Kartoffel, Weizen, Mais, Reis, Soyabohne, Citrus oder *Arabidopsis* codiert.
7. Genetisch modifizierte Pflanzenzelle nach einem der Ansprüche 1 bis 6, die eine modifizierte Stärke synthetisiert im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen.
8. Genetisch modifizierte Pflanzenzelle nach Anspruch 7, wobei die modifizierte Stärke dadurch gekennzeichnet ist, dass sie einen erhöhten Gehalt an Stärkephosphat und/oder eine veränderte Phosphatverteilung aufweist, im Vergleich zu Stärke, isoliert aus entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen.
9. Genetisch modifizierte Pflanzenzelle nach Anspruch 8, wobei die modifizierte Stärke dadurch gekennzeichnet ist, dass sie ein verändertes Verhältnis von C-3-Phosphat zu C-6-Phosphat aufweist.

10. Pflanze enthaltend genetisch modifizierte Pflanzenzellen nach einem der Ansprüche 1 bis 9.
11. Pflanze nach Anspruch 10, die eine Stärke speichernde Pflanze ist.
12. Pflanze nach Anspruch 11, die eine Maispflanze oder Weizenpflanze ist.
13. Vermehrungsmaterial von Pflanzen nach einem der Ansprüche 10, 11 oder 12, enthaltend genetisch modifizierte Pflanzenzellen nach einem der Ansprüche 1 bis 9.
14. Erntebare Pflanzenteile von Pflanzen nach einem der Ansprüche 10, 11 oder 12, enthaltend genetisch modifizierte Pflanzenzellen nach einem der Ansprüche 1 bis 9.
15. Verfahren zur Herstellung einer genetisch modifizierten Pflanze nach einem der Ansprüche 10, 11 oder 12, worin
 - a) eine Pflanzenzelle genetisch modifiziert wird, wobei die genetische Modifikation zur Erhöhung der Aktivität eines OK1 Proteins und eines R1 Proteins im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen führt;
 - b) aus Pflanzenzellen von Schritt a) eine Pflanze regeneriert wird; und
 - c) gegebenenfalls weitere Pflanzen mit Hilfe der Pflanzen nach Schritt b) erzeugt werden.
16. Verfahren nach Anspruch 15, worin die genetische Modifikation in der Einführung eines fremden Nucleinsäuremoleküls in das Genom der Pflanzenzelle besteht.
17. Verfahren nach Anspruch 16, wobei mindestens ein besagtes fremdes Nucleinsäuremolekül ein R1 Protein codiert.
18. Verfahren nach Anspruch 16, wobei mindestens ein besagtes fremdes Nucleinsäuremolekül ein OK1 Protein codiert.
19. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 bis 18, worin die genetisch modifizierte Pflanze im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzen eine modifizierte Stärke synthetisiert.

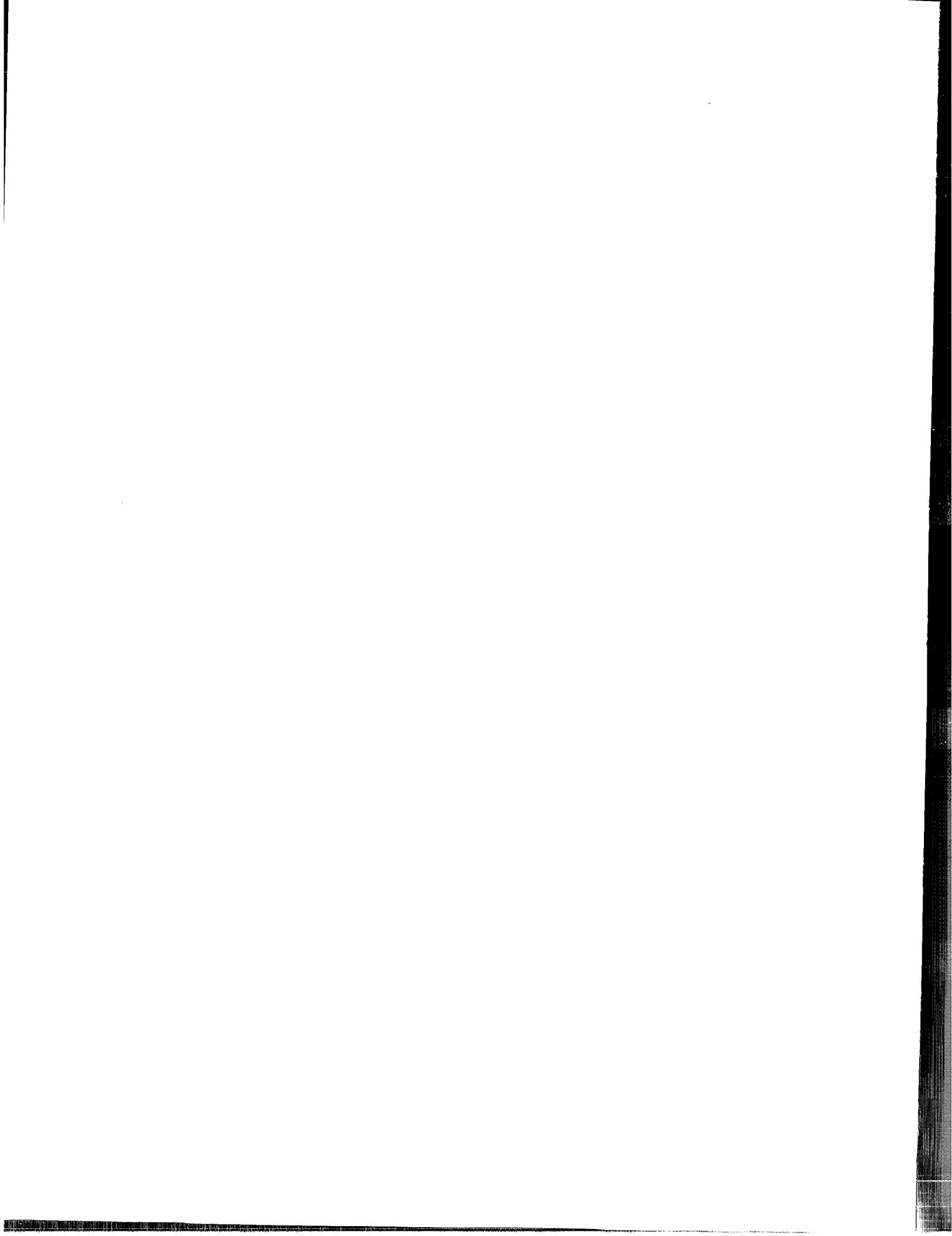
20. Verfahren nach Anspruch 19, worin die modifizierte Stärke dadurch gekennzeichnet ist, dass sie einen erhöhten Gehalt an kovalent an die Stärke gebundenem Phosphat aufweist.
21. Verfahren nach Anspruch 19 oder 20, worin die modifizierte Stärke dadurch gekennzeichnet ist, dass sie ein verändertes Verhältnis von C-3-Phosphat zu C-6-Phosphat aufweist.
22. Modifizierte Stärke erhältlich aus einer genetisch modifizierten Pflanze nach einem der Ansprüche 10, 11 oder 12, aus Vermehrungsmaterial nach Anspruch 13 oder aus erntebaren Pflanzenteilen nach Anspruch 14.
23. Verfahren zur Herstellung einer modifizierten Stärke umfassend den Schritt der Extraktion der Stärke aus einer genetisch modifizierten Pflanzenzelle nach einem der Ansprüche 1 bis 9.
24. Verfahren zur Herstellung einer modifizierten Stärke umfassend den Schritt der Extraktion der Stärke aus einer Pflanze nach einem der Ansprüche 10, 11 oder 12.,
25. Verwendung von Pflanzen nach einem der Ansprüche 10, 11 oder 12 zur Herstellung einer modifizierten Stärke.
26. Modifizierte Stärke erhältlich nach einem Verfahren nach einem der Ansprüche 23 oder 24.
27. Verfahren zur Herstellung einer derivatisierten Stärke, worin modifizierte Stärke nach Anspruch 22 oder 26 derivatisiert wird.
28. Derivatierte Stärke erhältlich nach einem Verfahren nach Anspruch 27.
29. Verwendung von modifizierter Stärke nach einem der Ansprüche 22 oder 26 zur Herstellung von derivatisierter Stärke.
30. Mehle, enthaltend modifizierte Stärke nach Anspruch 22 oder 26.
31. Mehle, erhältlich aus Pflanzenzellen nach einem der Ansprüche 1 bis 9, aus Teilen von Pflanzen nach einem der Ansprüche 10, 11 oder 12, aus Vermehrungsmaterial nach Anspruch 13 oder aus erntebaren Pflanzenteilen nach Anspruch 14.

32. Verfahren zur Herstellung von Mehlen, umfassend den Schritt des Mahlens von Pflanzenteilen von Pflanzen nach einem der Ansprüche 10, 11 oder 12 oder von Vermehrungsmaterial nach Anspruch 13 oder erntebarem Material nach Anspruch 14.
33. Verwendung von genetisch modifizierten Pflanzenzellen nach einem der Ansprüche 1 bis 9 oder von Pflanzen nach einem der Ansprüche 10, 11 oder 12 zur Herstellung von Mehlen.
34. Rekombinantes Nukleinsäuremolekül enthaltend ein Nucleinsäuremolekül codierend ein OK1 Protein und ein Nucleinsäuremolekül codierend ein R1 Protein.
35. Vektor enthaltend ein rekombinantes Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 34.
36. Vektor nach Anspruch 35, wobei die rekombinanten Nucleinsäuremoleküle mit regulatorischen Sequenzen verknüpft sind, die die Transkription in prokaryontischen oder eukaryontischen Zellen initiieren.
37. Wirtszelle, die genetisch modifiziert ist mit einem rekombinanten Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 34 oder mit einem Vektor nach einem der Ansprüche 35 oder 36.
38. Zusammensetzung enthaltend ein rekombinantes Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 34 oder einen Vektor nach einem der Ansprüche 35 oder 36.
39. Zusammensetzung enthaltend eine Nucleinsäuresequenz codierend ein OK1 Protein und eine Nucleinsäuresequenz codierend ein R1 Protein.
40. Verwendung einer Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 38 oder 39 zur Transformation von Pflanzenzellen.

EPO-BERLIN
05-03-2004

Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft Pflanzenzellen und Pflanzen, die genetisch modifiziert sind, wobei die genetische Modifikation zur Erhöhung der Aktivität eines Stärke phosphorylierenden OK1 Proteins und eines Stärke phosphorylierenden R1 Proteins im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen führt. Ferner betrifft die vorliegende Erfindung Mittel und Verfahren zur Herstellung solcher Pflanzenzellen und Pflanzen. Derartige Pflanzenzellen und Pflanzen synthetisieren eine modifizierte Stärke. Die vorliegende Erfindung betrifft daher auch die von den erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und Pflanzen synthetisierte Stärke, Verfahren zur Herstellung dieser Stärke, sowie die Herstellung von Stärkederivaten dieser modifizierten Stärke, als auch Mehle, enthaltend erfindungsgemäße Stärken. Weiterhin betrifft die vorliegende Erfindung, Nucleinsäuremoleküle und Vektoren, enthaltend Sequenzen, die für ein OK1 Protein und ein R1 Protein codieren, sowie Wirtszellen, die diese Nucleinsäuremoleküle enthalten.



1 / 5

EPO-BERLIN

05-03-2004

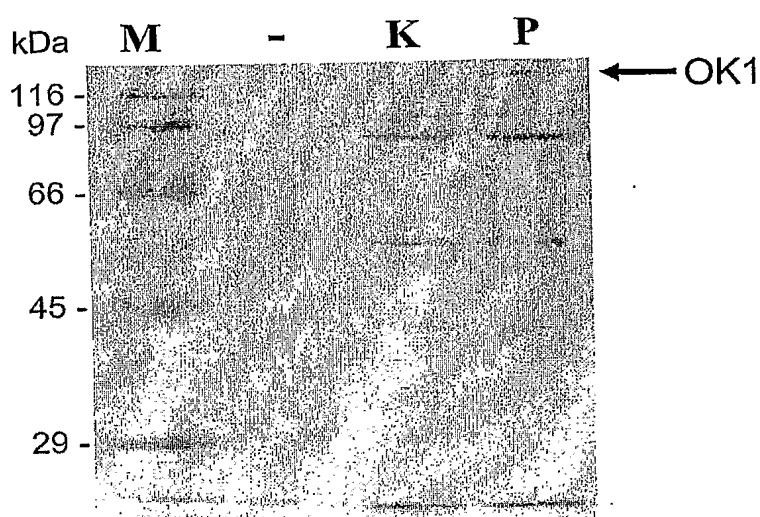


Fig. 1

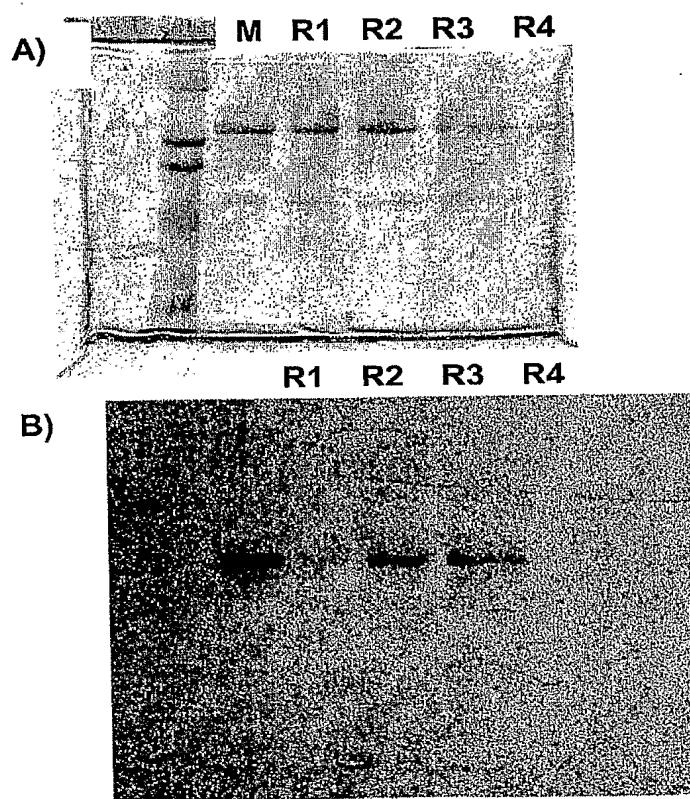


Fig. 2

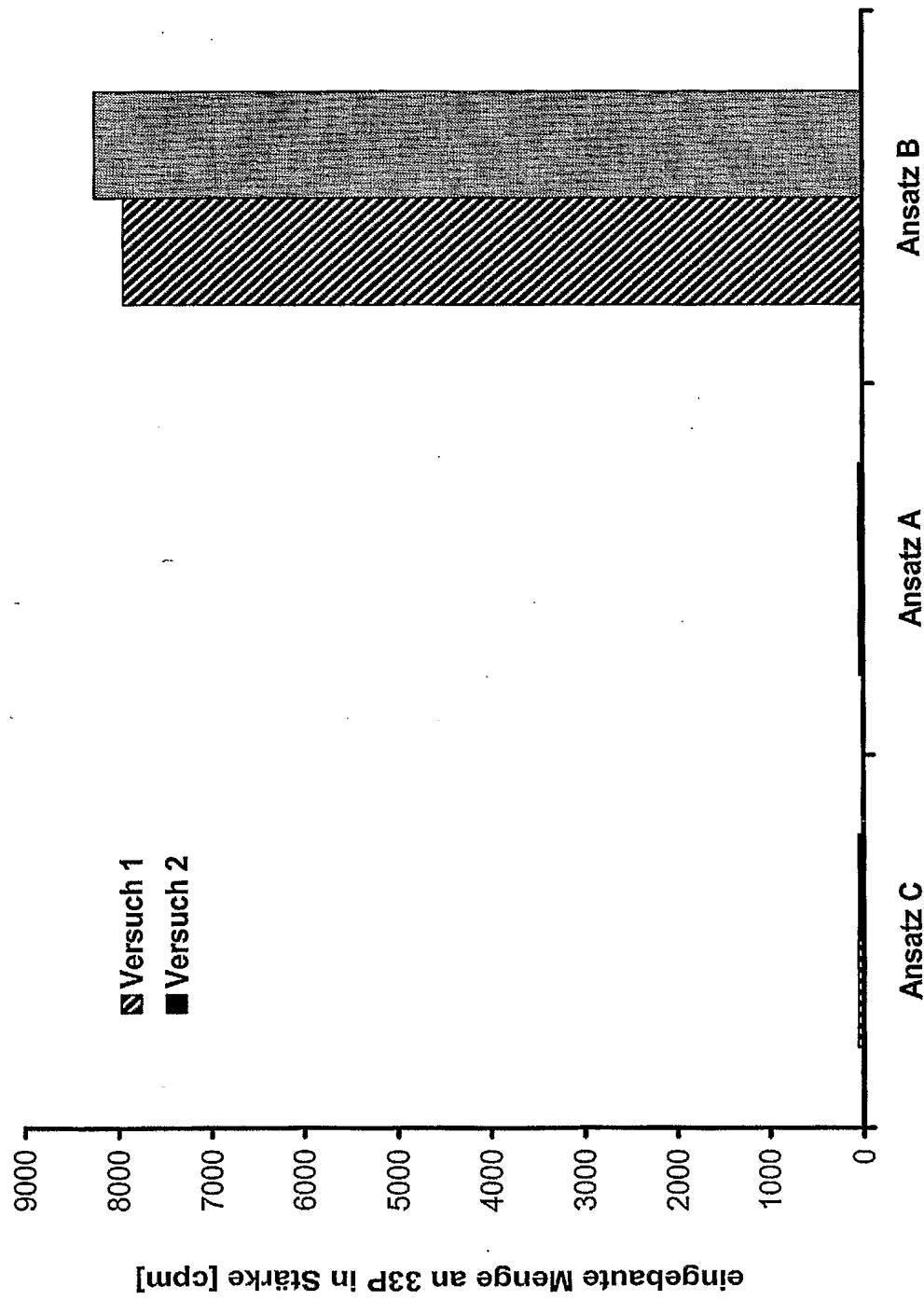


Fig.: 3

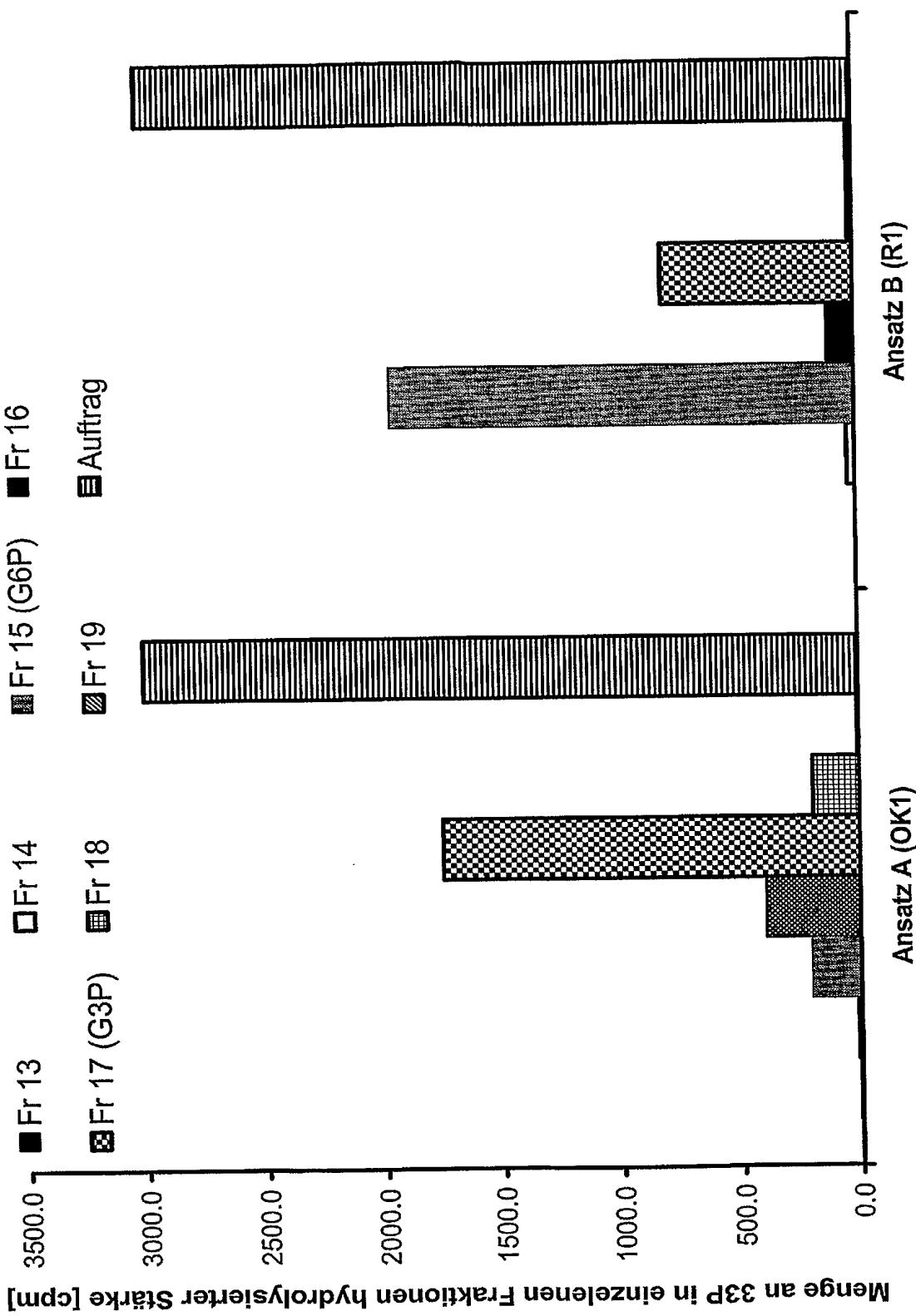


Fig. 4

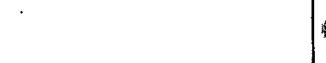
	Randomisierte ATP		gamma ATP		Randomisierte ATP	
	30°C	95°C	30°C	95°C	NaOH	HCl
A)						
B)						

Fig. 5

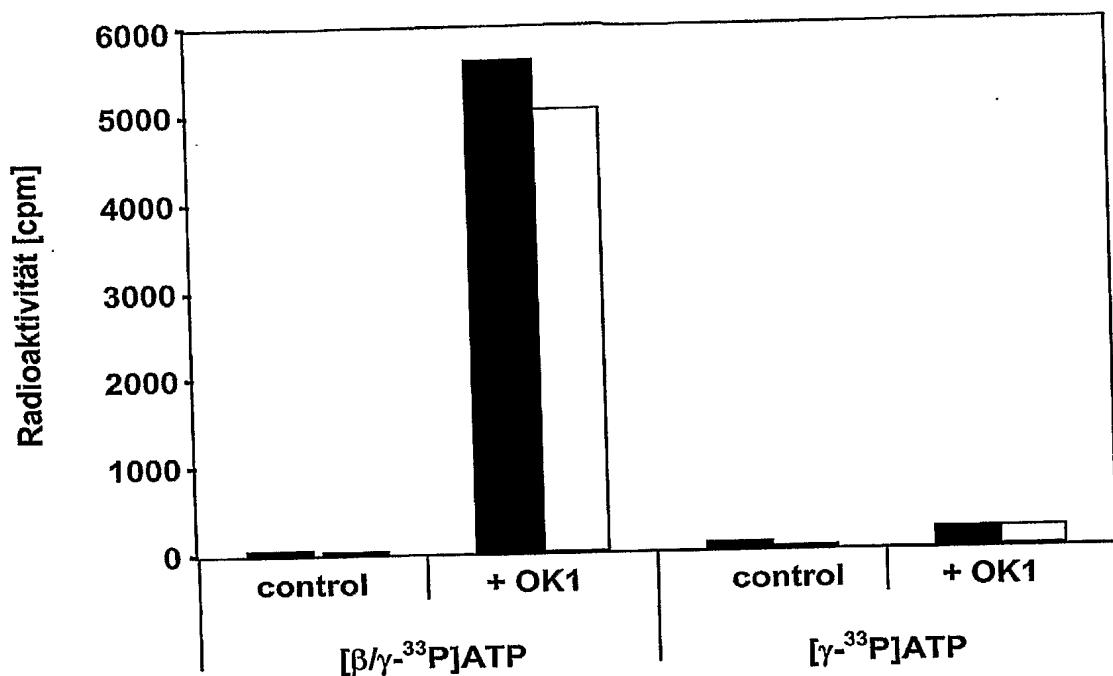
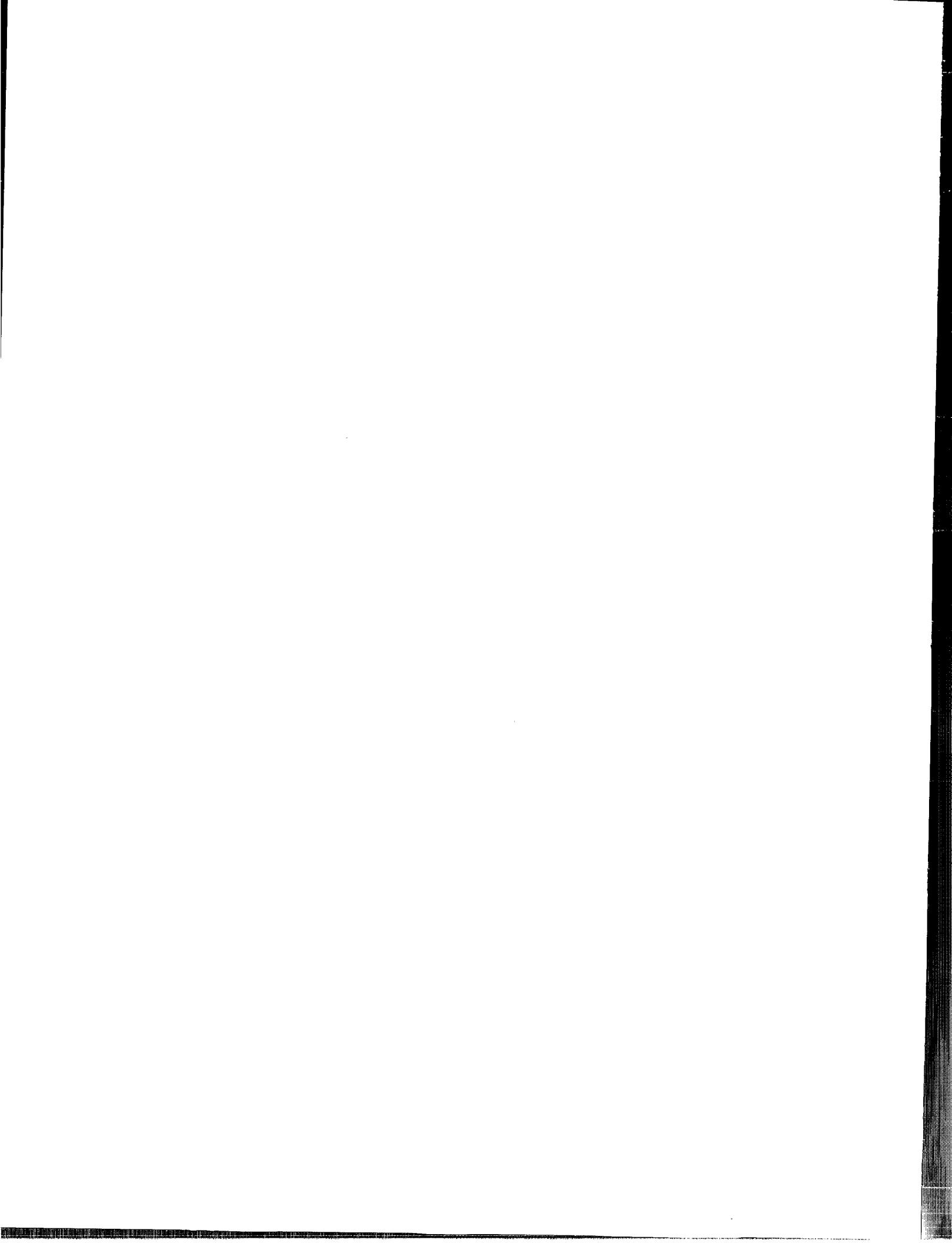


Fig. 6



BCS 04-5003_Erhöhte Akt. OK1 & R1SEQUENZPROTOKOLL.ST25
SEQUENCE LISTING

EPO-DE-1111

<110> Bayer Cropscience GmbH

05-03-2004

<120> Pflanzen mit erhöhter Aktivität mehrerer Stärke phosphorylierender Enzyme

<130> BCS 04-5003-EP

<160> 17

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 3591

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(3591)

<223>

<400> 1		
atg gag agc att ggc agc cat tgt tgc agc tct cct ttc acc ttc atc		48
Met Glu Ser Ile Gly Ser His Cys Cys Ser Ser Pro Phe Thr Phe Ile		
1 5 10 15		
act aga aac tca tca tca ctt cct aga ctc gtt aac atc act cac		96
Thr Arg Asn Ser Ser Ser Leu Pro Arg Leu Val Asn Ile Thr His		
20 25 30		
aga gtt aat ctc agc cac caa tct cac cga ctc aga aac tcc aat tct		144
Arg Val Asn Leu Ser His Gln Ser His Arg Leu Arg Asn Ser Asn Ser		
35 40 45		
cgt ctc act tgc act gct act tct tct tcc acc att gag gaa caa cgg		192
Arg Leu Thr Cys Thr Ala Thr Ser Ser Ser Thr Ile Glu Glu Gln Arg		
50 55 60		
aag aag aaa gat gga tca gga acg aaa gtg agg ttg aat gtg agg tta		240
Lys Lys Lys Asp Gly Ser Gly Thr Lys Val Arg Leu Asn Val Arg Leu		
65 70 75 80		
gat cat caa gtt aat ttt ggt gac cat gtg gct atg ttt gga tca gct		288
Asp His Gln Val Asn Phe Gly Asp His Val Ala Met Phe Gly Ser Ala		
85 90 95		

BCS 04-5003_Erhöhte Akt. OK1 & R1_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

aaa gag att ggt tca tgg aaa aag aaa tcg cct ttg aat tgg agt gag	336
Lys Glu Ile Gly Ser Trp Lys Lys Lys Ser Pro Leu Asn Trp Ser Glu	
100 105 110	
aat gga tgg gtt tgt gag ttg gaa ctt gac ggt ggt cag gtt ttg gag	384
Asn Gly Trp Val Cys Glu Leu Glu Leu Asp Gly Gly Gln Val Leu Glu	
115 120 125	
tat aag ttt gtc att gtt aag aat gat ggt tca ctt tca tgg gaa tct	432
Tyr Lys Phe Val Ile Val Lys Asn Asp Gly Ser Leu Ser Trp Glu Ser	
130 135 140	
ggt gat aat cgt gtc ctt aag gtt cca aat tct ggg aat ttt tct gtt	480
Gly Asp Asn Arg Val Leu Lys Val Pro Asn Ser Gly Asn Phe Ser Val	
145 150 155 160	
gtt tgt cat tgg gat gct act aga gaa acc ctt gat ttg cct cag gag	528
Val Cys His Trp Asp Ala Thr Arg Glu Thr Leu Asp Leu Pro Gln Glu	
165 170 175	
gtt ggt aat gat gat gat gtt ggt gat ggt ggg cat gag agg gat aat	576
Val Gly Asn Asp Asp Asp Val Gly Asp Gly Gly His Glu Arg Asp Asn	
180 185 190	
cat gat gtt ggt gat gat aga gta gtg gga agt gaa aat ggt gcg cag	624
His Asp Val Gly Asp Asp Arg Val Val Gly Ser Glu Asn Gly Ala Gln	
195 200 205	
ctt cag aag agt aca ttg ggt ggg caa tgg caa ggt aaa gat gcg tcc	672
Leu Gln Lys Ser Thr Leu Gly Gly Gln Trp Gln Gly Lys Asp Ala Ser	
210 215 220	
ttt atg cgt tct aat gat cat ggt aac aga gaa gtt ggt aga aat tgg	720
Phe Met Arg Ser Asn Asp His Gly Asn Arg Glu Val Gly Arg Asn Trp	
225 230 235 240	
gat act agt ggt ctt gaa ggc aca gct ctt aag atg gtt gag ggt gat	768
Asp Thr Ser Gly Leu Glu Gly Thr Ala Leu Lys Met Val Glu Gly Asp	
245 250 255	
cgc aac tct aag aac tgg tgg aga aag ctt gaa atg gta cgc gag gtt	816
Arg Asn Ser Lys Asn Trp Trp Arg Lys Leu Glu Met Val Arg Glu Val	
260 265 270	
ata gtt ggg agt gtt gag agg gag gaa cga ttg aag gcg ctc ata tac	864
Ile Val Gly Ser Val Glu Arg Glu Glu Arg Leu Lys Ala Leu Ile Tyr	
275 280 285	
tct gca att tat ttg aag tgg ata aac aca ggt cag att cct tgt ttt	912
Ser Ala Ile Tyr Leu Lys Trp Ile Asn Thr Gly Gln Ile Pro Cys Phe	
290 295 300	
gaa gat gga ggg cat cac cgt cca aac agg cat gcc gag att tcc aga	960
Glu Asp Gly Gly His His Arg Pro Asn Arg His Ala Glu Ile Ser Arg	
305 310 315 320	
ctt ata ttc cgt gag ttg gag cac att tgc agt aag aaa gat gct act	1008
Leu Ile Phe Arg Glu Leu Glu His Ile Cys Ser Lys Lys Asp Ala Thr	
325 330 335	
cca gag gaa gtg ctt gtt gct cgg aaa atc cat ccg tgt tta cct tct	1056
Pro Glu Glu Val Leu Val Ala Arg Lys Ile His Pro Cys Leu Pro Ser	
340 345 350	
tcc aaa gca gag ttt act gca gct gtc cct cta act cgg att agg gac	1104
Phe Lys Ala Glu Phe Thr Ala Ala Val Pro Leu Thr Arg Ile Arg Asp	
355 360 365	

BCS 04-5003_Erhöhte Akt. OK1 & R1_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

ata	gcc	cat	cg	aat	gat	att	cct	cat	gat	ctc	aag	caa	gaa	atc	aag	1152
Ile	Ala	His	Arg	Asn	Asp	Ile	Pro	His	Asp	Leu	Lys	Gln	Glu	Ile	Lys	
370						375				380						
cat	acg	ata	caa	aat	aag	ctt	cac	cg	aat	gct	ggt	cca	gaa	gat	cta	1200
His	Thr	Ile	Gln	Asn	Lys	Leu	His	Arg	Asn	Ala	Gly	Pro	Glu	Asp	Leu	
385						390				395						400
att	gca	aca	gaa	gca	atg	ctt	caa	cga	att	acc	gag	acc	cca	gga	aaa	1248
Ile	Ala	Thr	Glu	Ala	Met	Leu	Gln	Arg	Ile	Thr	Glu	Thr	Pro	Gly	Lys	
					405				410							415
tat	agt	gga	gac	ttt	gtg	gag	cag	ttt	aaa	ata	ttc	cat	aat	gag	ctt	1296
Tyr	Ser	Gly	Asp	Phe	Val	Glu	Gln	Phe	Lys	Ile	Phe	His	Asn	Glu	Leu	
					420				425							430
aaa	gat	ttc	ttt	aat	gct	gga	agt	ctc	act	gaa	cag	ctt	gat	tct	atg	1344
Lys	Asp	Phe	Phe	Asn	Ala	Gly	Ser	Leu	Thr	Glu	Gln	Leu	Asp	Ser	Met	
					435				440							445
aaa	att	tct	atg	gat	gat	aga	ggt	ctt	tct	gcg	ctc	aat	ttg	ttt	ttt	1392
Lys	Ile	Ser	Met	Asp	Asp	Arg	Gly	Leu	Ser	Ala	Leu	Asn	Leu	Phe	Phe	
					450				455							460
gaa	tgt	aaa	aag	cgc	ctt	gac	aca	tca	gga	gaa	tca	agc	aat	gtt	ttg	1440
Glu	Cys	Lys	Lys	Arg	Leu	Asp	Thr	Ser	Gly	Glu	Ser	Ser	Asn	Val	Leu	
					465				470							475
gag	ttg	att	aaa	acc	atg	cat	tct	cta	gct	tct	tta	aga	gaa	aca	att	1488
Glu	Leu	Ile	Lys	Thr	Met	His	Ser	Leu	Ala	Ser	Leu	Arg	Glu	Thr	Ile	
					485				490							495
ata	aag	gaa	ctt	aat	agc	ggc	ttg	cga	aat	gat	gct	cct	gat	act	gcc	1536
Ile	Lys	Glu	Leu	Asn	Ser	Gly	Leu	Arg	Asn	Asp	Ala	Pro	Asp	Thr	Ala	
					500				505							510
att	gca	atg	cgc	cag	aag	tgg	cgc	ctt	tgt	gag	atc	ggc	ctc	gag	gac	1584
Ile	Ala	Met	Arg	Gln	Lys	Trp	Arg	Leu	Cys	Glu	Ile	Gly	Leu	Glu	Asp	
					515				520							525
tac	ttt	ttt	gtt	cta	cta	agc	aga	ttc	ctc	aat	gct	ctt	gaa	act	atg	1632
Tyr	Phe	Phe	Val	Leu	Leu	Ser	Arg	Phe	Leu	Asn	Ala	Leu	Glu	Thr	Met	
					530				535							540
gga	gga	gct	gat	caa	ctg	gca	aaa	gat	gtg	gga	tca	aga	aac	gtt	gcc	1680
Gly	Gly	Ala	Asp	Gln	Leu	Ala	Lys	Asp	Val	Gly	Ser	Arg	Asn	Val	Ala	
					545				550							555
tca	tgg	aat	gat	cca	cta	gat	gct	ttg	gtg	ttg	ggt	gtt	cac	caa	gt	1728
Ser	Trp	Asn	Asp	Pro	Leu	Asp	Ala	Leu	Val	Leu	Gly	Val	His	Gln	Val	
					565				570							575
ggt	cta	tct	ggt	tgg	aag	caa	gaa	gaa	tgt	tta	gcc	att	gga	aat	gaa	1776
Gly	Leu	Ser	Gly	Trp	Lys	Gln	Glu	Glu	Cys	Leu	Ala	Ile	Gly	Asn	Glu	
					580				585							590
ctc	ctt	gct	tgg	cga	gaa	agg	gac	cta	ctt	gaa	aaa	gaa	ggg	gaa	gag	1824
Leu	Leu	Ala	Trp	Arg	Glu	Arg	Asp	Leu	Leu	Glu	Lys	Glu	Gly	Glu	Glu	
					595				600							605
gat	gga	aaa	aca	att	tgg	gcc	atg	agg	ctg	aaa	gca	act	ctt	gat	cga	1872
Asp	Gly	Lys	Thr	Ile	Trp	Ala	Met	Arg	Leu	Lys	Ala	Thr	Leu	Asp	Arg	
					610				615							620
gca	cgc	aga	tta	aca	gca	gaa	tat	tct	gat	ttg	ctt	ctt	caa	ata	ttt	1920
Ala	Arg	Arg	Leu	Thr	Ala	Glu	Tyr	Ser	Asp	Leu	Leu	Leu	Gln	Ile	Phe	
					625				630							635
																640

BCS 04-5003_Erhöhte Akt. OK1 & R1_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

cct cct aat gtg gag att tta gga aaa gct cta gga att cca gag aat Pro Pro Asn Val Glu Ile Leu Gly Lys Ala Leu Gly Ile Pro Glu Asn 645 650 655	1968
agt gtc aag acc tat aca gaa gca gag att cgt gct gga att att ttc Ser Val Lys Thr Tyr Thr Glu Ala Glu Ile Arg Ala Gly Ile Ile Phe 660 665 670	2016
cag atc tca aag ctc tgc act gtt ctt cta aaa gct gta aga aat tca Gln Ile Ser Lys Leu Cys Thr Val Leu Leu Lys Ala Val Arg Ash Ser 675 680 685	2064
ctt ggt tct gag ggc tgg gat gtc gtt gta cct gga tcg acg tct ggg Leu Gly Ser Glu Gly Trp Asp Val Val Val Pro Gly Ser Thr Ser Gly 690 695 700	2112
aca tta gtt cag gtt gag agc att gtt ccg gga tca ttg cca gca act Thr Leu Val Gln Val Glu Ser Ile Val Pro Gly Ser Leu Pro Ala Thr 705 710 715 720	2160
tct ggt ggt cct att att ctc ttg gtc aat aaa gct gat ggc gat gaa Ser Gly Gly Pro Ile Ile Leu Leu Val Asn Lys Ala Asp Gly Asp Glu 725 730 735	2208
gag gta agt gct gct aat ggg aac ata gct gga gtc atg ctt ctg cag Glu Val Ser Ala Ala Asn Gly Asn Ile Ala Gly Val Met Leu Leu Gln 740 745 750	2256
gag ctg cct cac ttg tct cac ctt ggc gtt aga gcg cgg cag gag aaa Glu Leu Pro His Leu Ser His Leu Gly Val Arg Ala Arg Gln Glu Lys 755 760 765	2304
att gtc ttt gtg aca tgt gat gat gat gac aag gtt gct gat ata cga Ile Val Phe Val Thr Cys Asp Asp Asp Asp Lys Val Ala Asp Ile Arg 770 775 780	2352
cga ctt gtg gga aaa ttt gtg agg ttg gaa gca tct cca agt cat gtg Arg Leu Val Gly Lys Phe Val Arg Leu Glu Ala Ser Pro Ser His Val 785 790 795 800	2400
aat ctg ata ctt tca act gag ggt agg agt cgc act tcc aaa tcc agt Asn Leu Ile Leu Ser Thr Glu Gly Arg Ser Arg Thr Ser Lys Ser Ser 805 810 815	2448
gcg acc aaa aaa acg gat aag aac agc tta tct aag aaa aaa aca gat Ala Thr Lys Lys Thr Asp Lys Asn Ser Leu Ser Lys Lys Lys Thr Asp 820 825 830	2496
aag aag agc tta tct atc gat gat gaa gaa tca aag cct ggt tcc tca Lys Lys Ser Leu Ser Ile Asp Asp Glu Glu Ser Lys Pro Gly Ser Ser 835 840 845	2544
tct tcc aat agc ctc ctt tac tct tcc aag gat atc cct agt gga gga Ser Ser Asn Ser Leu Leu Tyr Ser Ser Lys Asp Ile Pro Ser Gly Gly 850 855 860 880	2592
atc ata gca ctt gct gat gca gat gta cca act tct ggt tca aaa tct Ile Ile Ala Leu Ala Asp Ala Asp Val Pro Thr Ser Gly Ser Lys Ser 865 870 875 880	2640
gct gca tgt ggt ctt ctt gca tct tta gca gaa gcc tct agt aaa gtg Ala Ala Cys Gly Leu Leu Ala Ser Leu Ala Glu Ala Ser Ser Lys Val 885 890 895	2688
cac agc gaa cac gga gtt ccg gca tca ttt aag gtt cca act gga gtt His Ser Glu His Gly Val Pro Ala Ser Phe Lys Val Pro Thr Gly Val 900 905 910	2736

BCS 04-5003_Erhöhte Akt. OK1 & R1_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

gtc ata cct ttt gga tcg atg gaa tta gct tta aag caa aat aat tcg	2784
Val Ile Pro Phe Gly Ser Met Glu Leu Ala Leu Lys Gln Asn Asn Ser	
915 920 925	
gaa gaa aag ttt gcg tct ttg cta gaa aaa cta gaa acc gcc aga cct	2832
Glu Glu Lys Phe Ala Ser Leu Leu Glu Lys Leu Glu Thr Ala Arg Pro	
930 935 940	
gag ggt ggt gag cta gac gac ata tgt gac cag atc cat gaa gtg atg	2880
Glu Gly Gly Glu Leu Asp Asp Ile Cys Asp Gln Ile His Glu Val Met	
945 950 955 960	
aaa acg ttg caa gtg cct aaa gaa aca atc aac agc ata agc aaa gcg	2928
Lys Thr Leu Gln Val Pro Lys Glu Thr Ile Asn Ser Ile Ser Lys Ala	
965 970 975	
ttt ctc aaa gat gct cgt ctc att gtt cgt tca agt gct aac gtc gag	2976
Phe Leu Lys Asp Ala Arg Leu Ile Val Arg Ser Ser Ala Asn Val Glu	
980 985 990	
gac tta gcc gga atg tca gct gca gga ctc tat gaa tca atc cct aac	3024
Asp Leu Ala Gly Met Ser Ala Ala Gly Leu Tyr Glu Ser Ile Pro Asn	
995 1000 1005	
gtg agt ccc tcg gat cct ttg gtg ttt tca gat tcg gtt tgc caa	3069
Val Ser Pro Ser Asp Pro Leu Val Phe Ser Asp Ser Val Cys Gln	
1010 1015 1020	
gtt tgg gct tct ctc tac aca aga aga gct gtt cta agc cgt aga	3114
Val Trp Ala Ser Leu Tyr Thr Arg Arg Ala Val Leu Ser Arg Arg	
1025 1030 1035	
gct gct ggt gtc tct caa aga gaa gct tca atg gct gtt ctc gtt	3159
Ala Ala Gly Val Ser Gln Arg 1040 1045	
1040 1045	
1050	
caa gaa atg ctt tcg ccg gac tta tca ttc gtt ctg cac aca gto	3204
Gln Glu Met Leu Ser Pro Asp 1055 1060	
1055 1060	
1065	
agt cca gct gat ccg gac agt aac ctt gto gaa gcc gag atc gct	3249
Ser Pro Ala Asp Pro Asp Ser 1070 1075	
1070 1075	
1080	
cct ggt tta ggt gag act tta gct tca gga aca aga gga aca cca	3294
Pro Gly Leu Gly Glu Thr Leu Ala Ser Gly Thr Arg Gly Thr Pro	
1085 1090 1095	
tgg aga ctc gct tcg ggt aag ctc gac ggg att gta caa acc tta	3339
Trp Arg Leu Ala Ser Gly Lys 1100 1105	
1100 1105	
1110	
gct ttc gca aac ttc agc gaa gag ctt ctt gto tca gga aca ggt	3384
Ala Phe Ala Asn Phe Ser Glu 1115 1120	
1115 1120	
1125	
cct gct gat gga aaa tac gtt cgg ttg acc gto gac tat agc aaa	3429
Pro Ala Asp Gly Lys Tyr Val 1130 1135	
1130 1135	
1140	
aaa cgt tta act gtt gac tcg gtg ttt aga cag cag ctc ggt cag	3474
Lys Arg Leu Thr Val Asp Ser Val Phe Arg Gln Gln Leu Gly Gln	
1145 1150 1155	
1155	
aga ctc ggt tcg gtt ggt ttc ttc ttg gaa aga aac ttt ggc tgt	3519
Arg Leu Gly Ser Val Gly Phe Phe Leu Glu Arg Asn Phe Gly Cys	
1160 1165 1170	

BCS 04-5003_Erhöhte Akt. OK1 & R1_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

gct caa gac gtt gaa ggt tgt ttg gtt ggt gaa gat gtt tac att 3564
Ala Gln Asp Val Glu Gly Cys Leu Val Gly Glu Asp Val Tyr Ile
1175 1180 1185

gtt cag tca agg cca caa cct ctg tag 3591
Val Gln Ser Arg Pro Gln Pro Leu
1190 1195

<210> 2

<211> 1196

<212> PRT

<213> *Arabidopsis thaliana*

<400> 2

Met Glu Ser Ile Gly Ser His Cys Cys Ser Ser Pro Phe Thr Phe Ile
1 5 10 15

Thr Arg Asn Ser Ser Ser Leu Pro Arg Leu Val Asn Ile Thr His
20 25 30

Arg Val Asn Leu Ser His Gln Ser His Arg Leu Arg Asn Ser Asn Ser
35 40 45

Arg Leu Thr Cys Thr Ala Thr Ser Ser Ser Thr Ile Glu Glu Gln Arg
50 55 60

Lys Lys Lys Asp Gly Ser Gly Thr Lys Val Arg Leu Asn Val Arg Leu
65 70 75 80

Asp His Gln Val Asn Phe Gly Asp His Val Ala Met Phe Gly Ser Ala
85 90 95

Lys Glu Ile Gly Ser Trp Lys Lys Ser Pro Leu Asn Trp Ser Glu
100 105 110

Asn Gly Trp Val Cys Glu Leu Glu Leu Asp Gly Gly Gln Val Leu Glu
115 120 125

Tyr Lys Phe Val Ile Val Lys Asn Asp Gly Ser Leu Ser Trp Glu Ser
130 135 140

Gly Asp Asn Arg Val Leu Lys Val Pro Asn Ser Gly Asn Phe Ser Val
145 150 155 160

Val Cys His Trp Asp Ala Thr Arg Glu Thr Leu Asp Leu Pro Gln Glu
165 170 175

Val Gly Asn Asp Asp Asp Val Gly Asp Gly Gly His Glu Arg Asp Asn
180 185 190

BCS 04-5003_Erhöhte Akt. OK1 & R1_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

His Asp Val Gly Asp Asp Arg Val Val Gly Ser Glu Asn Gly Ala Gln
195 200 205

Leu Gln Lys Ser Thr Leu Gly Gly Gln Trp Gln Gly Lys Asp Ala Ser
210 215 220

Phe Met Arg Ser Asn Asp His Gly Asn Arg Glu Val Gly Arg Asn Trp
225 230 235 240

Asp Thr Ser Gly Leu Glu Gly Thr Ala Leu Lys Met Val Glu Gly Asp
245 250 255

Arg Asn Ser Lys Asn Trp Trp Arg Lys Leu Glu Met Val Arg Glu Val
260 265 270

Ile Val Gly Ser Val Glu Arg Glu Glu Arg Leu Lys Ala Leu Ile Tyr
275 280 285

Ser Ala Ile Tyr Leu Lys Trp Ile Asn Thr Gly Gln Ile Pro Cys Phe
290 295 300

Glu Asp Gly Gly His His Arg Pro Asn Arg His Ala Glu Ile Ser Arg
305 310 315 320

Leu Ile Phe Arg Glu Leu Glu His Ile Cys Ser Lys Lys Asp Ala Thr
325 330 335

Pro Glu Glu Val Leu Val Ala Arg Lys Ile His Pro Cys Leu Pro Ser
340 345 350

Phe Lys Ala Glu Phe Thr Ala Ala Val Pro Leu Thr Arg Ile Arg Asp
355 360 365

Ile Ala His Arg Asn Asp Ile Pro His Asp Leu Lys Gln Glu Ile Lys
370 375 380

His Thr Ile Gln Asn Lys Leu His Arg Asn Ala Gly Pro Glu Asp Leu
385 390 395 400

Ile Ala Thr Glu Ala Met Leu Gln Arg Ile Thr Glu Thr Pro Gly Lys
405 410 415

Tyr Ser Gly Asp Phe Val Glu Gln Phe Lys Ile Phe His Asn Glu Leu
420 425 430

Lys Asp Phe Phe Asn Ala Gly Ser Leu Thr Glu Gln Leu Asp Ser Met
435 440 445

Lys Ile Ser Met Asp Asp Arg Gly Leu Ser Ala Leu Asn Leu Phe Phe
450 455 460

BCS 04-5003_Erhöhte Akt. OK1 & R1_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

Glu Cys Lys Lys Arg Leu Asp Thr Ser Gly Glu Ser Ser Asn Val Leu
465 470 475 480

Glu Leu Ile Lys Thr Met His Ser Leu Ala Ser Leu Arg Glu Thr Ile
485 490 495

Ile Lys Glu Leu Asn Ser Gly Leu Arg Asn Asp Ala Pro Asp Thr Ala
500 505 510

Ile Ala Met Arg Gln Lys Trp Arg Leu Cys Glu Ile Gly Leu Glu Asp
515 520 525

Tyr Phe Phe Val Leu Leu Ser Arg Phe Leu Asn Ala Leu Glu Thr Met
530 535 540

Gly Gly Ala Asp Gln Leu Ala Lys Asp Val Gly Ser Arg Asn Val Ala
545 550 555 560

Ser Trp Asn Asp Pro Leu Asp Ala Leu Val Leu Gly Val His Gln Val
565 570 575

Gly Leu Ser Gly Trp Lys Gln Glu Glu Cys Leu Ala Ile Gly Asn Glu
580 585 590

Leu Leu Ala Trp Arg Glu Arg Asp Leu Leu Glu Lys Glu Gly Glu Glu
595 600 605

Asp Gly Lys Thr Ile Trp Ala Met Arg Leu Lys Ala Thr Leu Asp Arg
610 615 620

Ala Arg Arg Leu Thr Ala Glu Tyr Ser Asp Leu Leu Leu Gln Ile Phe
625 630 635 640

Pro Pro Asn Val Glu Ile Leu Gly Lys Ala Leu Gly Ile Pro Glu Asn
645 650 655

Ser Val Lys Thr Tyr Thr Glu Ala Glu Ile Arg Ala Gly Ile Ile Phe
660 665 670

Gln Ile Ser Lys Leu Cys Thr Val Leu Leu Lys Ala Val Arg Asn Ser
675 680 685

Leu Gly Ser Glu Gly Trp Asp Val Val Val Pro Gly Ser Thr Ser Gly
690 695 700

Thr Leu Val Gln Val Glu Ser Ile Val Pro Gly Ser Leu Pro Ala Thr
705 710 715 720

Ser Gly Gly Pro Ile Ile Leu Leu Val Asn Lys Ala Asp Gly Asp Glu
725 730 735

BCS 04-5003_Erhöhte Akt. OK1 & R1_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

Glu Val Ser Ala Ala Asn Gly Asn Ile Ala Gly Val Met Leu Leu Gln
740 745 750

Glu Leu Pro His Leu Ser His Leu Gly Val Arg Ala Arg Gln Glu Lys
755 760 765

Ile Val Phe Val Thr Cys Asp Asp Asp Asp Lys Val Ala Asp Ile Arg
770 775 780

Arg Leu Val Gly Lys Phe Val Arg Leu Glu Ala Ser Pro Ser His Val
785 790 795 800

Asn Leu Ile Leu Ser Thr Glu Gly Arg Ser Arg Thr Ser Lys Ser Ser
805 810 815

Ala Thr Lys Lys Thr Asp Lys Asn Ser Leu Ser Lys Lys Thr Asp
820 825 830

Lys Lys Ser Leu Ser Ile Asp Asp Glu Glu Ser Lys Pro Gly Ser Ser
835 840 845

Ser Ser Asn Ser Leu Leu Tyr Ser Ser Lys Asp Ile Pro Ser Gly Gly
850 855 860

Ile Ile Ala Leu Ala Asp Ala Asp Val Pro Thr Ser Gly Ser Lys Ser
865 870 875 880

Ala Ala Cys Gly Leu Leu Ala Ser Leu Ala Glu Ala Ser Ser Lys Val
885 890 895

His Ser Glu His Gly Val Pro Ala Ser Phe Lys Val Pro Thr Gly Val
900 905 910

Val Ile Pro Phe Gly Ser Met Glu Leu Ala Leu Lys Gln Asn Asn Ser
915 920 925

Glu Glu Lys Phe Ala Ser Leu Leu Glu Lys Leu Glu Thr Ala Arg Pro
930 935 940

Glu Gly Gly Glu Leu Asp Asp Ile Cys Asp Gln Ile His Glu Val Met
945 950 955 960

Lys Thr Leu Gln Val Pro Lys Glu Thr Ile Asn Ser Ile Ser Lys Ala
965 970 975

Phe Leu Lys Asp Ala Arg Leu Ile Val Arg Ser Ser Ala Asn Val Glu
980 985 990

Asp Leu Ala Gly Met Ser Ala Ala Gly Leu Tyr Glu Ser Ile Pro Asn
995 1000 1005

BCS 04-5003_Erhöhte Akt. OK1 & R1_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

Val Ser Pro Ser Asp Pro Leu Val Phe Ser Asp Ser Val Cys Gln
1010 1015 1020

Val Trp Ala Ser Leu Tyr Thr Arg Arg Ala Val Leu Ser Arg Arg
1025 1030 1035

Ala Ala Gly Val Ser Gln Arg Glu Ala Ser Met Ala Val Leu Val
1040 1045 1050

Gln Glu Met Leu Ser Pro Asp Leu Ser Phe Val Leu His Thr Val
1055 1060 1065

Ser Pro Ala Asp Pro Asp Ser Asn Leu Val Glu Ala Glu Ile Ala
1070 1075 1080

Pro Gly Leu Gly Glu Thr Leu Ala Ser Gly Thr Arg Gly Thr Pro
1085 1090 1095

Trp Arg Leu Ala Ser Gly Lys Leu Asp Gly Ile Val Gln Thr Leu
1100 1105 1110

Ala Phe Ala Asn Phe Ser Glu Glu Leu Leu Val Ser Gly Thr Gly
1115 1120 1125

Pro Ala Asp Gly Lys Tyr Val Arg Leu Thr Val Asp Tyr Ser Lys
1130 1135 1140

Lys Arg Leu Thr Val Asp Ser Val Phe Arg Gln Gln Leu Gly Gln
1145 1150 1155

Arg Leu Gly Ser Val Gly Phe Phe Leu Glu Arg Asn Phe Gly Cys
1160 1165 1170

Ala Gln Asp Val Glu Gly Cys Leu Val Gly Glu Asp Val Tyr Ile
1175 1180 1185

Val Gln Ser Arg Pro Gln Pro Leu
1190 1195

<210> 3

<211> 3644

<212> DNA

<213> Oryza sativa

<220>

<221> CDS

<222> (13)..(3633)

<223>

<400> 3
 cgaggaggat ca atg acg tcg ctg cg₅ ccc ctc gaa acc tcg ctc tcc ata
 Met Thr Ser Leu Arg Pro Leu Glu Thr Ser Leu Ser Ile
 1 5 10
 ggc ggc agg ccg cgc cgt ggt ctc gtc ctc cc₅ ccg ccc gga gtc ggt
 Gly Gly Arg Pro Arg Arg Gly Leu Val Leu Pro Pro Pro Gly Val Gly
 15 20 25
 ggc ggt gtg ctg ctc cgc cgg gga g₅ g₁₀ ctc cct ggg cgg cgc
 Ala Gly Val Leu Leu Arg Arg Gly Ala Met Ala Leu Pro Gly Arg Arg
 30 35 40 45
 ggc ttc g₅ cgc tgc cgc ggg aga tcc g₁₀ g₁₅ ctc g₂₀ g₂₅ gca gag aga aca
 Gly Phe Ala Cys Arg Gly Arg Ser Ala Ala Ser Ala Ala Glu Arg Thr
 50 55 60
 aag gag aaa aag aga aga gat tct tca aag cag cca ttg g₅ g₁₀ cat ctc
 Lys Glu Lys Lys Arg Arg Asp Ser Ser Lys Gln Pro Leu Val His Leu
 65 70 75
 cag gtt tgt cta gag cac cag gtt aag ttt ggt gag cat gta ggc att
 Gln Val Cys Leu Glu His Gln Val Lys Phe Gly Glu His Val Gly Ile
 80 85 90
 atc ggt tcc aca aag gag ctt ggt tca tgg gag cag gtt gaa ctg
 Ile Gly Ser Thr Lys Glu Leu Gly Ser Trp Glu Gln Val Glu Leu
 95 100 105
 gaa tgg act aca aat ggt tgg gtc tgc cag ctt aag ctc cct gga gaa
 Glu Trp Thr Thr Asn Gly Trp Val Cys Gln Leu Lys Leu Pro Gly Glu
 110 115 120 125
 aca ctt gtg gag ttt aaa ttt gtt ata ttt ttg g₅ g₁₀ g₁₅ g₂₀ g₂₅ aag gat
 Thr Leu Val Glu Phe Lys Phe Val Ile Phe Leu Val Gly Gly Lys Asp
 130 135 140
 aaa ata tgg gaa gat ggt aat aac cgt gtt gtt gag ctg cc₅ aag gat
 Lys Ile Trp Glu Asp Gly Asn Asn Arg Val Val Glu Leu Pro Lys Asp
 145 150 155
 ggt aag ttt gat ata gta tgc cac tgg aat aga aca gaa gag cca tta
 Gly Lys Phe Asp Ile Val Cys His Trp Asn Arg Thr Glu Glu Pro Leu
 160 165 170
 gaa ctt tta gga aca cca aag ttt gag ttg gtc gga gaa gct gaa aag
 Glu Leu Leu Gly Thr Pro Lys Phe Glu Leu Val Gly Glu Ala Glu Lys
 175 180 185
 aat act ggc gag gat gct tca gca tct gta act ttt gca cct gaa aaa
 Asn Thr Gly Glu Asp Ala Ser Ala Ser Val Thr Phe Ala Pro Glu Lys
 190 195 200 205
 gtt caa gat att tca gtt gtt gag aat ggt gat cca gca cca gag gcc
 Val Gln Asp Ile Ser Val Val Glu Asn Gly Asp Pro Ala Pro Glu Ala
 210 215 220
 gag tca agc aaa ttt ggt ggg caa tgg caa gga agt aaa act gtt ttc
 Glu Ser Ser Lys Phe Gly Gly Gln Trp Gln Gly Ser Lys Thr Val Phe
 225 230 235
 atg aga tca aat gag cat ctg aat aag gag gct gat agg atg tgg gat
 Seite 11

BCS 04-5003_Erhöhte Akt. OK1 & R1_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

Met Arg Ser Asn Glu His Leu Asn Lys Glu Ala Asp Arg Met Trp Asp
 240 245 250

aca act ggg ctt gat gga ata gca ctg aaa ctg gtc gag ggc gat aaa 819
 Thr Thr Gly Leu Asp Gly Ile Ala Leu Lys Leu Val Glu Gly Asp Lys
 255 260 265

gca tcc agg aac tgg tgg cgg aag tta gag gtt gtt cgc ggg ata ttg 867
 Ala Ser Arg Asn Trp Trp Arg Lys Leu Glu Val Val Arg Gly Ile Leu
 270 275 280 285

tca gaa tct ttt gat gac cag agt cgt ctg ggg gcc ctt gta tac tca 915
 Ser Glu Ser Phe Asp Asp Gln Ser Arg Leu Gly Ala Leu Val Tyr Ser
 290 295 300

gct att tat ctg aag tgg att tat aca ggt cag ata tcg tgc ttt gaa 963
 Ala Ile Tyr Leu Lys Trp Ile Tyr Thr Gly Gln Ile Ser Cys Phe Glu
 305 310 315

gat ggt ggc cac cat cgg cct aac aaa cat gct gag ata tcg agg caa 1011
 Asp Gly His His Arg Pro Asn Lys His Ala Glu Ile Ser Arg Gln
 320 325 330

ata ttc cgt gaa ctt gaa atg atg tat tat ggg aaa acc aca tca gcc 1059
 Ile Phe Arg Glu Leu Glu Met Met Tyr Tyr Gly Lys Thr Thr Ser Ala
 335 340 345

aag gat gtt ctc gtg att cgc aaa att cat ccc ttt tta cct tca ttt 1107
 Lys Asp Val Leu Val Ile Arg Lys Ile His Pro Phe Leu Pro Ser Phe
 350 355 360 365

aag tca gag ttt aca gcc tct gtc cct cta aca cga att cgt gat att 1155
 Lys Ser Glu Phe Thr Ala Ser Val Pro Leu Thr Arg Ile Arg Asp Ile
 370 375 380

gct cac cgg aat gac atc cca cat gat ctc aag caa gaa atc aag cat 1203
 Ala His Arg Asn Asp Ile Pro His Asp Leu Lys Gln Glu Ile Lys His
 385 390 395

act ata caa aac aaa ctt cat cgt aat gct gga cct gag gat ctt att 1251
 Thr Ile Gln Asn Lys Leu His Arg Asn Ala Gly Pro Glu Asp Leu Ile
 400 405 410

gct aca gaa gtc atg ctt gct agg att act aag acc cct gga gaa tac 1299
 Ala Thr Glu Val Met Leu Ala Arg Ile Thr Lys Thr Pro Gly Glu Tyr
 415 420 425

agt gaa aca ttt gtt gaa caa ttc acg ata ttt tat agc gaa cta aaa 1347
 Ser Glu Thr Phe Val Glu Gln Phe Thr Ile Phe Tyr Ser Glu Leu Lys
 430 435 440 445

gat ttc ttc aat gct ggc agc cta ttt gag caa ctg gag tcc atc aag 1395
 Asp Phe Phe Asn Ala Gly Ser Leu Phe Glu Gln Leu Glu Ser Ile Lys
 450 455 460

gaa tct ctg aac gag tca ggc tta gaa gtt ctc tca tcc ttt gtg gaa 1443
 Glu Ser Leu Asn Glu Ser Gly Leu Glu Val Leu Ser Ser Phe Val Glu
 465 470 475

acc aaa agg agt ttg gac caa gtg gat cat gca gaa gat ttg gat aaa 1491
 Thr Lys Arg Ser Leu Asp Gln Val Asp His Ala Glu Asp Leu Asp Lys
 480 485 490

aat gat acc att caa att ttg atg act acc ttg caa tca tta tct tct 1539
 Asn Asp Thr Ile Gln Ile Leu Met Thr Thr Leu Gln Ser Leu Ser Ser
 495 500 505

cta aga tcg gtt cta atg aag ggc ctt gaa agt ggc ctt aga aat gat 1587

BCS 04-5003_Erhöhte Akt. OK1 & R1_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

Leu Arg Ser Val Leu Met Lys Gly Leu Glu Ser Gly Leu Arg Asn Asp	525	
510 515	520	
gct cct gat aat gct ata gca atg cga caa aag tgg cgc ctt tgt gaa	1635	
Ala Pro Asp Asn Ala Ile Ala Met Arg Gln Lys Trp Arg Leu Cys Glu	540	
530 535	540	
att agt ctt gag gat tat tca ttt gtt ctg tta agc aga ttc atc aat	1683	
Ile Ser Leu Glu Asp Tyr Ser Phe Val Leu Leu Ser Arg Phe Ile Asn	555	
545 550	555	
act ctt gaa gcc tta ggt gga tca gct tca ctt gca aag gat gta gct	1731	
Thr Leu Glu Ala Leu Gly Gly Ser Ala Ser Leu Ala Lys Asp Val Ala	570	
560 565	570	
aga aat act act cta tgg gat act act ctt gat gcc ctt gtc att ggc	1779	
Arg Asn Thr Thr Leu Trp Asp Thr Thr Leu Asp Ala Leu Val Ile Gly	585	
575 580	585	
atc aat caa gtt agc ttt tca ggt tgg aaa aca gat gaa tgt att gcc	1827	
Ile Asn Gln Val Ser Phe Ser Gly Trp Lys Thr Asp Glu Cys Ile Ala	605	
590 595	600	605
ata ggg aat gag att ctt tcc tgg aag caa aaa ggt cta tct gaa agt	1875	
Ile Gly Asn Glu Ile Leu Ser Trp Lys Gln Lys Gly Leu Ser Glu Ser	620	
610 615	620	
gaa ggt tgt gaa gat ggg aaa tat att tgg tca cta aga ctt aaa gct	1923	
Glu Gly Cys Glu Asp Gly Lys Tyr Ile Trp Ser Leu Arg Leu Lys Ala	635	
625 630	635	
aca ctg gac aga gca cgg aga tta acg gaa gag tac tct gaa gca ctt	1971	
Thr Leu Asp Arg Ala Arg Arg Leu Thr Glu Glu Tyr Ser Glu Ala Leu	650	
640 645	650	
ctt tct ata ttc cct gaa aaa gta atg gtt att ggg aaa gcc ctt gga	2019	
Leu Ser Ile Phe Pro Glu Lys Val Met Val Ile Gly Lys Ala Leu Gly	665	
655 660	665	
ata cca gat aac agt gtg aga act tac aca gag gca gaa att cgt gct	2067	
Ile Pro Asp Asn Ser Val Arg Thr Tyr Thr Glu Ala Glu Ile Arg Ala	685	
670 675	680	685
ggc att gtt ttt cag gta tct aaa cta tgc aca gta ctt cag aaa gca	2115	
Gly Ile Val Phe Gln Val Ser Lys Leu Cys Thr Val Leu Gln Lys Ala	700	
690 695	700	
att cga gaa gta ctt gga tca act ggc tgg gat gtt ctt gtt cct gga	2163	
Ile Arg Glu Val Leu Gly Ser Thr Gly Trp Asp Val Leu Val Pro Gly	715	
705 710	715	
gtg gcc cat gga act ctg atg cgg gtg gaa aga att ctt cct gga tca	2211	
Val Ala His Gly Thr Leu Met Arg Val Glu Arg Ile Leu Pro Gly Ser	730	
720 725	730	
tta cct tca tct gtc aaa gaa cct gtg gtt cta att gta gat aag gct	2259	
Leu Pro Ser Ser Val Lys Glu Pro Val Val Leu Ile Val Asp Lys Ala	745	
735 740	745	
gat gga gat gaa gag gtc aaa gct gct ggg gat aat ata gtt ggt gtt	2307	
Asp Gly Asp Glu Glu Val Lys Ala Ala Gly Asp Asn Ile Val Gly Val	765	
750 755	760	765
att ctt ctt cag gaa cta cct cac ctt tca cat ctt ggt gtt aga gct	2355	
Ile Leu Leu Gln Glu Leu Pro His Leu Ser His Leu Gly Val Arg Ala	780	
770 775	775	780
cgt caa gag aat gtt gta ttt gta act tgt gaa tat gat gac aca gtt	2403	

BCS 04-5003_Erhöhte Akt. OK1 & R1_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

Arg	Gln	Glu	Asn	Val	Val	Phe	Val	Thr	Cys	Glu	Tyr	Asp	Asp	Thr	Val	785	790	795	
Thr	Asp	Val	Tyr	Leu	Leu	Glu	Gly	Lys	Tyr	Ile	Arg	Leu	Glu	Ala	Ser	800	805	810	2451
tcc	atc	aat	gtc	aat	ctc	tca	ata	gtt	tca	gaa	aaa	aat	gac	aat	gct	815	820	825	2499
Ser	Ile	Asn	Val	Asn	Leu	Ser	Ile	Val	Ser	Glu	Lys	Asn	Asp	Asn	Ala				
gtc	tct	aca	gaa	cca	aat	agt	aca	ggg	aat	cca	ttt	caa	cag	aaa	ctc	830	835	840	2547
Val	Ser	Thr	Glu	Pro	Asn	Ser	Thr	Gly	Asn	Pro	Phe	Gln	Gln	Lys	Leu				
caa	aat	gaa	ttc	tct	cta	cca	tcg	gat	atc	gag	atg	cca	ctg	caa	atg	850	855	860	2595
Gln	Asn	Glu	Phe	Ser	Leu	Pro	Ser	Asp	Ile	Glu	Met	Pro	Leu	Gln	Met				
tct	aag	caa	aaa	agc	aaa	tca	gga	gtg	aat	ggt	agt	ttt	gct	gct	ctt	865	870	875	2643
Ser	Lys	Gln	Ser	Lys	Ser	Gly	Val	Asn	Gly	Ser	Phe	Ala	Ala	Leu					
gag	ctt	tca	gaa	gct	tca	gtg	gaa	tca	gct	ggt	gca	aaa	gct	gct	gca	880	885	890	2691
Glu	Leu	Ser	Glu	Ala	Ser	Val	Glu	Ser	Ala	Gly	Ala	Lys	Ala	Ala	Ala				
tgc	aga	act	ctt	tct	gtt	ctt	gct	tca	ttg	tct	aat	aaa	gtc	tat	agt	895	900	905	2739
Cys	Arg	Thr	Leu	Ser	Val	Leu	Ala	Ser	Leu	Ser	Asn	Lys	Val	Tyr	Ser				
gat	caa	gga	gtt	cca	gca	gcc	ttt	aga	gtc	cct	tct	ggt	gct	gtg	ata	910	915	920	2787
Asp	Gln	Gly	Val	Pro	Ala	Ala	Phe	Arg	Val	Pro	Ser	Gly	Ala	Val	Ile				
cca	ttt	gga	tca	atg	gag	gat	gcf	ctc	aag	aaa	agt	gga	tca	ctg	gaa	930	935	940	2835
Pro	Phe	Gly	Ser	Met	Glu	Asp	Ala	Leu	Lys	Lys	Ser	Gly	Ser	Leu	Glu				
tcc	ttt	aca	agc	ctt	cta	gaa	aag	att	gaa	aca	gcc	aaa	gtc	gaa	aat	945	950	955	2883
Ser	Phe	Thr	Ser	Leu	Leu	Glu	Lys	Ile	Glu	Thr	Ala	Lys	Val	Glu	Asn				
ggt	gaa	gtt	gat	agc	ctg	gcf	ttg	gag	cta	caa	gca	ata	att	tca	cat	960	965	970	2931
Gly	Glu	Val	Asp	Ser	Leu	Ala	Leu	Glu	Leu	Gln	Ala	Ile	Ile	Ser	His				
ctt	tcc	cca	ccg	gag	gag	act	att	ata	ttt	ctc	aaa	aga	atc	ttc	cca	975	980	985	2979
Leu	Ser	Pro	Pro	Glu	Glu	Thr	Ile	Ile	Phe	Leu	Lys	Arg	Ile	Phe	Pro				
cag	gat	gtc	cgf	ttg	att	gtt	aga	tct	agt	gct	aat	gtg	gag	gat	ttg	990	995	1000	3027
Gln	Asp	Val	Arg	Leu	Ile	Val	Arg	Ser	Ser	Ala	Asn	Val	Glu	Asp	Leu				
gct	ggt	atg	tca	gct	gct	ggt	ctc	tat	gat	tca	att	ccc	aat	gtc	1010	1015	1020	3072	
Ala	Gly	Met	Ser	Ala	Ala	Gly	Leu	Tyr	Asp	Ser	Ile	Pro	Asn	Val					
agt	ctc	atg	gac	cca	tgt	gcc	ttt	gga	gct	gcf	gtt	ggg	aag	gtt	1025	1030	1035	3117	
Ser	Leu	Met	Asp	Pro	Cys	Ala	Phe	Gly	Ala	Ala	Val	Gly	Lys	Val					
tgg	gct	tct	tta	tac	aca	agg	aga	gcc	atc	cta	agc	cgt	cga	gcc	1040	1045	1050	3162	
Trp	Ala	Ser	Leu	Tyr	Thr	Arg	Arg	Ala	Ile	Leu	Ser	Arg	Arg	Ala					
gct	ggt	gtt	tat	cag	aga	gac	gcf	aca	atg	gct	gtt	ctt	gtc	caa				3207	

BCS 04-5003_Erhöhte Akt. OK1 & R1_SEQUENZPROTOKOLL.ST25
 Ala Gly Val Tyr Gln Arg Asp Ala Thr Met Ala Val Leu Val Gln
 1055 1060 1065

gaa ata ctg cag cca gat ctc tcc ttc gtg ctt cat act gtt tgc
 Glu Ile Leu Gln Pro Asp Leu Ser Phe Val Leu His Thr Val Cys
 1070 1075 1080

ccc gct gac cat gac ccc aag gtt gtc cag gct gag gtc gcc cct
 Pro Ala Asp His Asp Pro Lys Val Val Gln Ala Glu Val Ala Pro
 1085 1090 1095

ggg ctg ggt gaa acg ctt gct tca gga acc cgt ggc acc ccg tgg
 Gly Leu Gly Glu Thr Leu Ala Ser Gly Thr Arg Gly Thr Pro Trp
 1100 1105 1110

agg ctg tca tgt aac aaa ttc gat gga aaa gtt gcc act ctt gcc
 Arg Leu Ser Cys Asn Lys Phe Asp Gly Lys Val Ala Thr Leu Ala
 1115 1120 1125

ttt tca aat ttc agt gag gag atg gtg gtg cac aac tct ggt cct
 Phe Ser Asn Phe Ser Glu Glu Met Val Val His Asn Ser Gly Pro
 1130 1135 1140

gcc aat gga gaa gta att cgt ctt act gtt gat tac agc aag aag
 Ala Asn Gly Glu Val Ile Arg Leu Thr Val Asp Tyr Ser Lys Lys
 1145 1150 1155

cca ttg tcg gtt gat aca acc ttt agg aag cag ttt ggt cag cga
 Pro Leu Ser Val Asp Thr Thr Phe Arg Lys Gln Phe Gly Gln Arg
 1160 1165 1170

ctg gct gcg att ggc cag tat ctg gag cag aag ttc ggg agt gca
 Leu Ala Ala Ile Gly Gln Tyr Leu Glu Gln Lys Phe Gly Ser Ala
 1175 1180 1185

cag gat gtg gaa ggt tgc ctg gtt ggg aaa gat att ttt ata gtg
 Gln Asp Val Glu Gly Cys Leu Val Gly Lys Asp Ile Phe Ile Val
 1190 1195 1200

caa agc agg cca cag cca tag aagccgaatt c
 Gln Ser Arg Pro Gln Pro
 1205

<210> 4

<211> 1206

<212> PRT

<213> oryza sativa

<400> 4

Met Thr Ser Leu Arg Pro Leu Glu Thr Ser Leu Ser Ile Gly Gly Arg
 1 5 10 15

Pro Arg Arg Gly Leu Val Leu Pro Pro Pro Gly Val Gly Ala Gly Val
 20 25 30

Leu Leu Arg Arg Gly Ala Met Ala Leu Pro Gly Arg Arg Gly Phe Ala
 35 40 45

BCS 04-5003_Erhöhte Akt. OK1 & R1_SEQUENZPROTOKOLL.ST25
Cys Arg Gly Arg Ser Ala Ala Ser Ala Ala Glu Arg Thr Lys Glu Lys
50 55 60

Lys Arg Arg Asp Ser Ser Lys Gln Pro Leu Val His Leu Gln Val Cys
65 70 75 80

Leu Glu His Gln Val Lys Phe Gly Glu His Val Gly Ile Ile Gly Ser
85 90 95

Thr Lys Glu Leu Gly Ser Trp Glu Glu Gln Val Glu Leu Glu Trp Thr
100 105 110

Thr Asn Gly Trp Val Cys Gln Leu Lys Leu Pro Gly Glu Thr Leu Val
115 120 125

Glu Phe Lys Phe Val Ile Phe Leu Val Gly Gly Lys Asp Lys Ile Trp
130 135 140

Glu Asp Gly Asn Asn Arg Val Val Glu Leu Pro Lys Asp Gly Lys Phe
145 150 155 160

Asp Ile Val Cys His Trp Asn Arg Thr Glu Glu Pro Leu Glu Leu Leu
165 170 175

Gly Thr Pro Lys Phe Glu Leu Val Gly Glu Ala Glu Lys Asn Thr Gly
180 185 190

Glu Asp Ala Ser Ala Ser Val Thr Phe Ala Pro Glu Lys Val Gln Asp
195 200 205

Ile Ser Val Val Glu Asn Gly Asp Pro Ala Pro Glu Ala Glu Ser Ser
210 215 220

Lys Phe Gly Gly Gln Trp Gln Gly Ser Lys Thr Val Phe Met Arg Ser
225 230 235 240

Asn Glu His Leu Asn Lys Glu Ala Asp Arg Met Trp Asp Thr Thr Gly
245 250 255

Leu Asp Gly Ile Ala Leu Lys Leu Val Glu Gly Asp Lys Ala Ser Arg
260 265 270

Asn Trp Trp Arg Lys Leu Glu Val Val Arg Gly Ile Leu Ser Glu Ser
275 280 285

Phe Asp Asp Gln Ser Arg Leu Gly Ala Leu Val Tyr Ser Ala Ile Tyr
290 295 300

Leu Lys Trp Ile Tyr Thr Gly Gln Ile Ser Cys Phe Glu Asp Gly Gly
305 310 315 320

BCS 04-5003_Erhöhte Akt. OK1 & R1_SEQUENZPROTOKOLL.ST25
His His Arg Pro Asn Lys His Ala Glu Ile Ser Arg Gln Ile Phe Arg
325 330 335

Glu Leu Glu Met Met Tyr Tyr Gly Lys Thr Thr Ser Ala Lys Asp Val
340 345 350

Leu Val Ile Arg Lys Ile His Pro Phe Leu Pro Ser Phe Lys Ser Glu
355 360 365

Phe Thr Ala Ser Val Pro Leu Thr Arg Ile Arg Asp Ile Ala His Arg
370 375 380

Asn Asp Ile Pro His Asp Leu Lys Gln Glu Ile Lys His Thr Ile Gln
385 390 395 400

Asn Lys Leu His Arg Asn Ala Gly Pro Glu Asp Leu Ile Ala Thr Glu
405 410 415

Val Met Leu Ala Arg Ile Thr Lys Thr Pro Gly Glu Tyr Ser Glu Thr
420 425 430

Phe Val Glu Gln Phe Thr Ile Phe Tyr Ser Glu Leu Lys Asp Phe Phe
435 440 445

Asn Ala Gly Ser Leu Phe Glu Gln Leu Glu Ser Ile Lys Glu Ser Leu
450 455 460

Asn Glu Ser Gly Leu Glu Val Leu Ser Ser Phe Val Glu Thr Lys Arg
465 470 475 480

Ser Leu Asp Gln Val Asp His Ala Glu Asp Leu Asp Lys Asn Asp Thr
485 490 495

Ile Gln Ile Leu Met Thr Thr Leu Gln Ser Leu Ser Ser Leu Arg Ser
500 505 510

Val Leu Met Lys Gly Leu Glu Ser Gly Leu Arg Asn Asp Ala Pro Asp
515 520 525

Asn Ala Ile Ala Met Arg Gln Lys Trp Arg Leu Cys Glu Ile Ser Leu
530 535 540

Glu Asp Tyr Ser Phe Val Leu Leu Ser Arg Phe Ile Asn Thr Leu Glu
545 550 555 560

Ala Leu Gly Gly Ser Ala Ser Leu Ala Lys Asp Val Ala Arg Asn Thr
565 570 575

Thr Leu Trp Asp Thr Thr Leu Asp Ala Leu Val Ile Gly Ile Asn Gln
580 585 590

BCS 04-5003_Erhöhte Akt. OK1 & R1_SEQUENZPROTOKOLL.ST25
Val Ser Phe Ser Gly Trp Lys Thr Asp Glu Cys Ile Ala Ile Gly Asn
595 600 605

Glu Ile Leu Ser Trp Lys Gln Lys Gly Leu Ser Glu Ser Glu Gly Cys
610 615 620

Glu Asp Gly Lys Tyr Ile Trp Ser Leu Arg Leu Lys Ala Thr Leu Asp
625 630 635 640

Arg Ala Arg Arg Leu Thr Glu Glu Tyr Ser Glu Ala Leu Leu Ser Ile
645 650 655

Phe Pro Glu Lys Val Met Val Ile Gly Lys Ala Leu Gly Ile Pro Asp
660 665 670

Asn Ser Val Arg Thr Tyr Thr Glu Ala Glu Ile Arg Ala Gly Ile Val
675 680 685

Phe Gln Val Ser Lys Leu Cys Thr Val Leu Gln Lys Ala Ile Arg Glu
690 695 700

Val Leu Gly Ser Thr Gly Trp Asp Val Leu Val Pro Gly Val Ala His
705 710 715 720

Gly Thr Leu Met Arg Val Glu Arg Ile Leu Pro Gly Ser Leu Pro Ser
725 730 735

Ser Val Lys Glu Pro Val Val Leu Ile Val Asp Lys Ala Asp Gly Asp
740 745 750

Glu Glu Val Lys Ala Ala Gly Asp Asn Ile Val Gly Val Ile Leu Leu
755 760 765

Gln Glu Leu Pro His Leu Ser His Leu Gly Val Arg Ala Arg Gln Glu
770 775 780

Asn Val Val Phe Val Thr Cys Glu Tyr Asp Asp Thr Val Thr Asp Val
785 790 795 800

Tyr Leu Leu Glu Gly Lys Tyr Ile Arg Leu Glu Ala Ser Ser Ile Asn
805 810 815

Val Asn Leu Ser Ile Val Ser Glu Lys Asn Asp Asn Ala Val Ser Thr
820 825 830

Glu Pro Asn Ser Thr Gly Asn Pro Phe Gln Gln Lys Leu Gln Asn Glu
835 840 845

Phe Ser Leu Pro Ser Asp Ile Glu Met Pro Leu Gln Met Ser Lys Gln
850 855 860

BCS 04-5003_Erhöhte Akt. OK1 & R1_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

Lys Ser Lys Ser Gly Val Asn Gly Ser Phe Ala Ala Leu Glu Leu Ser
865 870 875 880

Glu Ala Ser Val Glu Ser Ala Gly Ala Lys Ala Ala Ala Cys Arg Thr
885 890 895

Leu Ser Val Leu Ala Ser Leu Ser Asn Lys Val Tyr Ser Asp Gln Gly
900 905 910

Val Pro Ala Ala Phe Arg Val Pro Ser Gly Ala Val Ile Pro Phe Gly
915 920 925

Ser Met Glu Asp Ala Leu Lys Lys Ser Gly Ser Leu Glu Ser Phe Thr
930 935 940

Ser Leu Leu Glu Lys Ile Glu Thr Ala Lys Val Glu Asn Gly Glu Val
945 950 955 960

Asp Ser Leu Ala Leu Glu Leu Gln Ala Ile Ile Ser His Leu Ser Pro
965 970 975

Pro Glu Glu Thr Ile Ile Phe Leu Lys Arg Ile Phe Pro Gln Asp Val
980 985 990

Arg Leu Ile Val Arg Ser Ser Ala Asn Val Glu Asp Leu Ala Gly Met
995 1000 1005

Ser Ala Ala Gly Leu Tyr Asp Ser Ile Pro Asn Val Ser Leu Met
1010 1015 1020

Asp Pro Cys Ala Phe Gly Ala Ala Val Gly Lys Val Trp Ala Ser
1025 1030 1035

Leu Tyr Thr Arg Arg Ala Ile Leu Ser Arg Arg Ala Ala Gly Val
1040 1045 1050

Tyr Gln Arg Asp Ala Thr Met Ala Val Leu Val Gln Glu Ile Leu
1055 1060 1065

Gln Pro Asp Leu Ser Phe Val Leu His Thr Val Cys Pro Ala Asp
1070 1075 1080

His Asp Pro Lys Val Val Gln Ala Glu Val Ala Pro Gly Leu Gly
1085 1090 1095

Glu Thr Leu Ala Ser Gly Thr Arg Gly Thr Pro Trp Arg Leu Ser
1100 1105 1110

Cys Asn Lys Phe Asp Gly Lys Val Ala Thr Leu Ala Phe Ser Asn
1115 1120 1125

BCS 04-5003_Erhöhte Akt. OK1 & R1_SEQUENZPROTOKOLL.ST25
Phe Ser Glu Glu Met Val Val His Asn Ser Gly Pro Ala Asn Gly
1130 1135 1140

Glu Val Ile Arg Leu Thr Val Asp Tyr Ser Lys Lys Pro Leu Ser
1145 1150 1155

Val Asp Thr Thr Phe Arg Lys Gln Phe Gly Gln Arg Leu Ala Ala
1160 1165 1170

Ile Gly Gln Tyr Leu Glu Gln Lys Phe Gly Ser Ala Gln Asp Val
1175 1180 1185

Glu Gly Cys Leu Val Gly Lys Asp Ile Phe Ile Val Gln Ser Arg
1190 1195 1200

Pro Gln Pro
1205

<210> 5

<211> 12

<212> PRT

<213> *Arabidopsis thaliana, Oryza sativa*

<400> 5

Leu Pro His Leu Ser His Leu Gly Val Arg Ala Arg
1 5 10

<210> 6

<211> 5124

<212> DNA

<213> *Citrus reticulata*

<220>

<221> CDS

<222> (257)..(4684)

<223>

<300>

<308> EMBL / AY094062

<309> 2003-05-03

BCS 04-5003_Erhöhte Akt. OK1 & R1_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

<400> 6	gcacgagctc ttattacaag gtgccacgcg tcgtccgcga ctgagataaa tcgcaagtgt	60
cgctccagat ttttagtactt gtttcttacg gactccgtga aaaaaaccaa aatcaaataa	120	
tagcgaatag ccatagtcac attctcagct tcataatataat ctttaccaag cagttatctct	180	
tcgtatattc accatccact tattcgttca tgctccaatt actctgagct aagaagtgt	240	
cattattgttag aggaat atg agc aat agc ata ggc cgt aat gta ctc cac cag	292	
Met Ser Asn Ser Ile Gly Arg Asn Val Leu His Gln		
1 5 10		
agc ttg ctt tgc tca acg gtt ttt gag cat caa agc aac cgt cat tct	340	
Ser Leu Leu Cys Ser Thr Val Phe Glu His Gln Ser Asn Arg His Ser		
15 20 25		
tct ggc att cct gca aac tct ttg ttt caa gct gtc tct ata aat caa	388	
Ser Gly Ile Pro Ala Asn Ser Leu Phe Gln Ala Val Ser Ile Asn Gln		
30 35 40		
ccg gcg ggg gcg tcg gca gca cgc aag tcg cct tta tct acc aaa ttt	436	
Pro Ala Gly Ala Ser Ala Ala Arg Lys Ser Pro Leu Ser Thr Lys Phe		
45 50 55 60		
tac ggg acg agt ttg aat gct aga cca aag atg gcc atg gga agg cat	484	
Tyr Gly Thr Ser Leu Asn Ala Arg Pro Lys Met Ala Met Gly Arg His		
65 70 75		
cgc cct gtt ttg atc act cca cgt gct gta tta gcc gtg gat tca gct	532	
Arg Pro Val Leu Ile Thr Pro Arg Ala Val Leu Ala Val Asp Ser Ala		
80 85 90		
tct gag ctt gca gga aaa ttc aac ctt gaa ggg aat gtt gaa ttg cag	580	
Ser Glu Leu Ala Gly Lys Phe Asn Leu Glu Gly Asn Val Glu Leu Gln		
95 100 105		
att aca gtt ggt gct cca act cca ggg tct ttg aca caa gta aat att	628	
Ile Thr Val Gly Ala Pro Thr Pro Gly Ser Leu Thr Gln Val Asn Ile		
110 115 120		
gag atc tca tat agt agc aat tcc ttg ctt ctg cac tgg ggt gcg ata	676	
Glu Ile Ser Tyr Ser Ser Asn Ser Leu Leu Leu His Trp Gly Ala Ile		
125 130 135 140		
cgt gac aaa aag gaa aag tgg gta ctt cct tct cgt ccg cca gat ggg	724	
Arg Asp Lys Lys Glu Lys Trp Val Leu Pro Ser Arg Pro Pro Asp Gly		
145 150 155		
acc aaa ata tta aag aat aga gcc ctt aga act ccc ttt gtg agc tct	772	
Thr Lys Ile Leu Lys Asn Arg Ala Leu Arg Thr Pro Phe Val Ser Ser		
160 165 170		
ggt tcc aaa tct ctc gtt aaa tta gag ata gat gat cct gca ata gaa	820	
Gly Ser Lys Ser Leu Val Lys Leu Glu Ile Asp Asp Pro Ala Ile Glu		
175 180 185		
gca gta gag ttt ctt ata ctc gat gaa gcc cag aat aaa tgg ttc aaa	868	
Ala Val Glu Phe Leu Ile Leu Asp Glu Ala Gln Asn Lys Trp Phe Lys		
190 195 200		
aac aat ggt gca aat ttt cat gta aag tta cca tca gag agg agt ttg	916	
Asn Asn Gly Ala Asn Phe His Val Lys Leu Pro Ser Glu Arg Ser Leu		
205 210 215 220		
att caa aat gtt tca gtt cct gaa gat ctt gta cag act caa gca tat	964	
Ile Gln Asn Val Ser Val Pro Glu Asp Leu Val Gln Thr Gln Ala Tyr		
225 230 235		

BCS 04-5003_Erhöhte Akt. OK1 & R1_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

tta agg tgg gaa aga aag ggt aaa cag att tat act cct gaa caa gag	1012
Leu Arg Trp Glu Arg Lys Gly Lys Gln Ile Tyr Thr Pro Glu Gln Glu	
240 245 250	
aag gag gag tat gaa gca gct cgc act gag ctg ctg gaa gaa att gtt	1060
Lys Glu Glu Tyr Glu Ala Ala Arg Thr Glu Leu Leu Glu Glu Ile Val	
255 260 265	
aga ggt act tct gtg gag gac ctg cga gca aaa cta aca aac aaa aat	1108
Arg Gly Thr Ser Val Glu Asp Leu Arg Ala Lys Leu Thr Asn Lys Asn	
270 275 280	
gat aga caa gaa att aag gaa tct tct tcc cat gga aca aaa aat gcg	1156
Asp Arg Gln Glu Ile Lys Glu Ser Ser His Gly Thr Lys Asn Ala	
285 290 295 300	
ata ccg gat gat ctt gtg caa ata caa tct tat ata cgg tgg gag aga	1204
Ile Pro Asp Asp Leu Val Gln Ile Gln Ser Tyr Ile Arg Trp Glu Arg	
305 310 315	
gct ggg aag ccc aat tac tct gca gac caa cag ctt aga gaa ttt gag	1252
Ala Gly Lys Pro Asn Tyr Ser Ala Asp Gln Gln Leu Arg Glu Phe Glu	
320 325 330 335	
gaa gca aga aaa gaa ttg caa tct gaa cta gag aag ggt atc tct ctt	1300
Glu Ala Arg Lys Glu Leu Gln Ser Glu Leu Glu Lys Gly Ile Ser Leu	
335 340 345	
gat gaa ata tgg aaa aag att aca aaa ggg gag atc cag act aag gtc	1348
Asp Glu Ile Trp Lys Lys Ile Thr Lys Gly Glu Ile Gln Thr Lys Val	
350 355 360	
tct gat caa ctt aaa act aaa aag tat ttt aga act gaa agg att cag	1396
Ser Asp Gln Leu Lys Thr Lys Tyr Phe Arg Thr Glu Arg Ile Gln	
365 370 375 380	
agg aag cag agg gac ttt atg cag att cta aac aaa cat gtg gct gaa	1444
Arg Lys Gln Arg Asp Phe Met Gln Ile Leu Asn Lys His Val Ala Glu	
385 390 395	
ccc aca gag aag aag aat att tca gtt gaa cca aaa gcc ttg aca cca	1492
Pro Thr Glu Lys Lys Asn Ile Ser Val Glu Pro Lys Ala Leu Thr Pro	
400 405 410	
gtt gaa ctt ttc gtc ggg gca act gaa gaa cag gag ggt gat tct att	1540
Val Glu Leu Phe Val Gly Ala Thr Glu Glu Gln Glu Gly Asp Ser Ile	
415 420 425	
ctt aac aag aag atc tac aag ctt gct ggc aaa gaa ctt ctg gta ctt	1588
Leu Asn Lys Lys Ile Tyr Lys Leu Ala Gly Lys Glu Leu Leu Val Leu	
430 435 440 445	
gtg cac aag cct ggt ggc aag acc aaa att cac cta gct act gat ggc	1636
Val His Lys Pro Gly Gly Lys Thr Lys Ile His Leu Ala Thr Asp Gly	
445 450 455 460	
aaa gag cca ctc att ctc cac tgg gct ttg tct aag aag gct gga gaa	1684
Lys Glu Pro Leu Ile Leu His Trp Ala Leu Ser Lys Ala Gly Glu	
465 470 475	
tgg ttg gct ccg cct cca agt gta ctg cct gca ggt tca gtt ttg ctg	1732
Trp Leu Ala Pro Pro Ser Val Leu Pro Ala Gly Ser Val Leu Leu	
480 485 490 495	
agt ggg tca gtt gaa aca aca ttc aca act agc tct ctt gcg gat ctg	1780
Ser Gly Ser Val Glu Thr Thr Phe Thr Thr Ser Ser Leu Ala Asp Leu	
495 500 505	

BCS 04-5003_Erhöhte Akt. OK1 & RI_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

cct tat cag gtc caa tca att gaa ata gag att gaa gaa gaa ggt tat Pro Tyr Gln Val Gln Ser Ile Glu Ile Glu Ile Glu Glu Glu Gly Tyr 510 515 520	1828
gtt gga atg cca tct gtc ctt cag tct ggc gga aac tgg ata aag aat Val Gly Met Pro Ser Val Leu Gln Ser Gly Gly Asn Trp Ile Lys Asn 525 530 535 540	1876
aag ggc tct gac ttc tat gtt gac ttt agc tat gaa tct aag caa gtt Lys Gly Ser Asp Phe Tyr Val Asp Phe Ser Tyr Glu Ser Lys Gln Val 545 550 555	1924
caa cag gat ttt ggc gat ggc aaa ggt acg gcc aag gct ttg ttg gag Gln Gln Asp Phe Gly Asp Gly Lys Gly Thr Ala Lys Ala Leu Leu Glu 560 565 570	1972
aaa ata gca gga ttg gaa att gag gca cag aag tcc ttt atg cac cgg Lys Ile Ala Gly Leu Glu Ile Glu Ala Gln Lys Ser Phe Met His Arg 575 580 585	2020
ttt aac att gca gca gac ttg ata caa gaa gcc aaa gag gct ggt gaa Phe Asn Ile Ala Ala Asp Leu Ile Gln Glu Ala Lys Glu Ala Gly Glu 590 595 600	2068
ctg ggc ttt gct ggg atc ttg gtg tgg atg agg ttt atg gct aca agg Leu Gly Phe Ala Gly Ile Leu Val Trp Met Arg Phe Met Ala Thr Arg 605 610 615 620	2116
cag cta ata tgg aat aaa aac tac aat gtt aaa cca cgt gaa atc agt Gln Leu Ile Trp Asn Lys Asn Tyr Asn Val Lys Pro Arg Glu Ile Ser 625 630 635	2164
aaa gcc cag gat agg ctt aca gac ctg ctc cag aat gtc tac att agt Lys Ala Gln Asp Arg Leu Thr Asp Leu Leu Gln Asn Val Tyr Ile Ser 640 645 650	2212
aat cca gag tat agg gaa att gtg cgc atg att ttg tct act gtt ggc Asn Pro Glu Tyr Arg Glu Ile Val Arg Met Ile Leu Ser Thr Val Glu 655 660 665	2260
cgt gga ggt gaa gga gat gtg gga cag cga att cgc gat gaa atc ctg Arg Gly Glu Gly Asp Val Gly Gln Arg Ile Arg Asp Glu Ile Leu 670 675 680	2308
gtt atc cag aga aac aat aat tgc aag ggt gga atg atg gaa gaa tgg Val Ile Gln Arg Asn Asn Cys Lys Gly Gly Met Met Glu Glu Trp 685 690 695 700	2356
cat cag aag ttg cat aat aac act agt cct gat gat gtt ata att tgt His Gln Lys Leu His Asn Asn Thr Ser Pro Asp Asp Val Ile Ile Cys 705 710 715	2404
cag gca ttg att gat tat att aaa agt gac ttc gac atc agt gcc tac Gln Ala Leu Ile Asp Tyr Ile Lys Ser Asp Phe Asp Ile Ser Ala Tyr 720 725 730	2452
tgg aag act ttg aat gac aat ggc att acg aaa gaa cgt ctt cta agt Trp Lys Thr Leu Asn Asp Asn Gly Ile Thr Lys Glu Arg Leu Leu Ser 735 740 745	2500
tat gat cgt gcg atc cat tct gag cca aac ttc aga aga gat cag aag Tyr Asp Arg Ala Ile His Ser Glu Pro Asn Phe Arg Arg Asp Gln Lys 750 755 760	2548
gat ggt ctg ctg cgt gac cta gga aac tac atg aga acc tta aag gcg Asp Gly Leu Leu Arg Asp Leu Gly Asn Tyr Met Arg Thr Leu Lys Ala 765 770 775 780	2596

BCS 04-5003_Erhöhte Akt. OK1 & R1_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

gtt	cat	tca	ggt	gca	gat	ctt	gag	tct	gct	atc	acg	aat	tgc	ttg	ggc	2644
Val	His	Ser	Gly	Ala	Asp	Leu	Glu	Ser	Ala	Ile	Thr	Asn	Cys	Leu	Gly	
785									790					795		
tac	aga	tct	gag	ggt	caa	ggg	ttc	atg	gtc	ggg	gtg	cag	ata	aat	cct	2692
Tyr	Arg	Ser	Glu	Gly	Gln	Gly	Phe	Met	Val	Gly	Val	Gln	Ile	Asn	Pro	
800							805					810				
ata	ccg	aac	ttg	cca	tct	gga	ttt	cca	gaa	ttg	ctt	caa	ttt	gtc	tct	2740
Ile	Pro	Asn	Leu	Pro	Ser	Gly	Phe	Pro	Glu	Leu	Leu	Gln	Phe	Val	Ser	
815							820					825				
gag	cat	gtt	gaa	gat	aga	aat	gta	gaa	gca	ttg	ctt	gag	ggt	ttg	ctg	2788
Glu	His	Val	Glu	Asp	Arg	Asn	Val	Glu	Ala	Leu	Leu	Glu	Gly	Leu	Leu	
830							835					840				
gag	gct	cgt	caa	gag	att	cg	cca	ttg	ctg	tgc	aag	cac	aat	gat	cgt	2836
Glu	Ala	Arg	Gln	Glu	Ile	Arg	Pro	Leu	Leu	Cys	Lys	His	Asn	Asp	Arg	
845							850				855				860	
ctg	aag	gat	cta	tta	ttt	ttg	gac	ata	gcc	ctt	gag	tct	agt	gtt	agg	2884
Leu	Lys	Asp	Leu	Leu	Phe	Leu	Asp	Ile	Ala	Leu	Glu	Ser	Ser	Val	Arg	
							865			870				875		
aca	gct	att	gaa	aaa	gga	tac	gag	gaa	ttg	aac	gag	gct	gga	ccg	gag	2932
Thr	Ala	Ile	Glu	Lys	Gly	Tyr	Glu	Glu	Leu	Asn	Glu	Ala	Gly	Pro	Glu	
							880			885			890			
aaa	atc	atg	tac	ttt	gtc	tct	ctg	att	ctt	gaa	aat	ctc	gca	ctt	tca	2980
Lys	Ile	Met	Tyr	Phe	Val	Ser	Leu	Ile	Leu	Glu	Asn	Leu	Ala	Leu	Ser	
							895			900			905			
tta	gat	gac	aat	gag	gat	ctc	atc	tac	tgt	tta	aag	ggt	tgg	agt	aat	3028
Leu	Asp	Asp	Asn	Glu	Asp	Leu	Ile	Tyr	Cys	Leu	Lys	Gly	Trp	Ser	Asn	
							910			915			920			
gct	tta	agc	atg	tcc	aag	agt	aaa	agt	gat	aac	tgg	gca	tta	ttt	gca	3076
Ala	Leu	Ser	Met	Ser	Lys	Ser	Lys	Ser	Asp	Asn	Trp	Ala	Leu	Phe	Ala	
							925			930			935			940
aaa	tca	gtt	ctt	gac	aga	act	cg	ctt	gca	ctc	gcc	ggc	aag	gca	gac	3124
Lys	Ser	Val	Leu	Asp	Arg	Thr	Arg	Leu	Ala	Leu	Ala	Gly	Lys	Ala	Asp	
							945			950			955			
tgg	tac	cag	aaa	gtt	ttg	caa	cct	tcg	gca	gag	tat	ctt	gga	acg	ctg	3172
Trp	Tyr	Gln	Lys	Val	Leu	Gln	Pro	Ser	Ala	Glu	Tyr	Leu	Gly	Thr	Leu	
							960			965			970			
ttg	agt	gtt	gat	aag	tgg	gct	gtg	gac	ata	ttt	aca	gaa	gaa	atg	atc	3220
Leu	Ser	Val	Asp	Lys	Trp	Ala	Val	Asp	Ile	Phe	Thr	Glu	Glu	Met	Ile	
							975			980			985			
cgt	gct	gga	tca	gct	gca	gct	cta	tcc	tta	ctc	ctt	aat	cga	ctt	gat	3268
Arg	Ala	Gly	Ser	Ala	Ala	Ala	Leu	Ser	Leu	Leu	Leu	Asn	Arg	Leu	Asp	
							990			995			1000			
cca	gtt	ctt	cg	aag	aca	gct	agt	ctg	gga	agt	tgg	cag	gtt	atc	3313	
Pro	Val	Leu	Arg	Lys	Thr	Ala	Ser	Leu	Gly	Ser	Trp	Gln	Val	Ile		
							1005			1010			1015			
agc	cct	gtt	gaa	gtt	ttt	gga	tat	gtc	gca	gtt	gtg	gat	gag	tta	3358	
Ser	Pro	Val	Glu	Val	Phe	Gly	Tyr	Val	Ala	Val	Val	Asp	Glu	Leu		
							1020			1025			1030			
cta	gct	gtg	cag	gat	aaa	tct	tat	gat	cag	cct	aca	ata	tta	ctg	3403	
Leu	Ala	Val	Gln	Asp	Lys	Ser	Tyr	Asp	Gln	Pro	Thr	Ile	Leu	Leu		
							1035			1040			1045			

BCS 04-5003_Erhöhte Akt. OK1 & R1_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

gca	aga	cgt	gta	aaa	gga	gag	gaa	gaa	att	cca	cat	ggc	aca	gtt	3448
Ala	Arg	Arg	Val	Lys	Gly	1055	Glu	Glu	Glu	Ile	Pro	His	Gly	Thr	Val
1050										1060					
gct	gta	ctg	aca	gcg	gat	atg	cca	gat	gtc	cta	tca	cat	gtt	tca	3493
Ala	Val	Leu	Thr	Ala	Asp	1070	Met	Pro	Asp	Val	Leu	Ser	His	Val	Ser
1065										1075					
gtt	cga	gct	aga	aat	tgc	aag	gtt	tgc	ttc	gct	aca	tgc	ttt	gat	3538
Val	Arg	Ala	Arg	Asn	Cys	1085	Lys	Val	Cys	Phe	Ala	Thr	Cys	Phe	Asp
1080										1090					
ccc	aat	atc	ttg	gct	gac	cta	caa	tca	aat	gaa	ggg	aaa	atg	ctg	3583
Pro	Asn	Ile	Leu	Ala	Asp	1100	Leu	Gln	Ser	Asn	Glut	Gly	Lys	Met	Leu
1095										1105					
cac	cta	aaa	cca	aca	tct	gct	gat	att	gca	tat	agt	gtg	gtg	gag	3628
His	Leu	Lys	Pro	Thr	Ser	1115	Ala	Asp	Ile	Ala	Tyr	Ser	Val	Val	Glut
1110										1120					
ggc	agt	gag	cta	caa	gat	tca	agt	tca	gct	aac	ttg	aaa	gaa	gaa	3673
Gly	Ser	Glu	Leu	Gln	Asp	1130	Ser	Ser	Ser	Ala	Asn	Leu	Lys	Glu	Glut
1125										1135					
gat	ggt	cct	tca	tct	tct	gtt	gca	tta	gtc	aaa	aag	cag	ttt	gct	3718
Asp	Gly	Pro	Ser	Ser	Ser	1145	Val	Ala	Leu	Val	Lys	Gly	Gln	Phe	Ala
1140										1150					
ggc	aga	tat	gct	ata	aca	tct	gat	gag	ttc	act	ggt	gaa	ctg	gtg	3763
Gly	Arg	Tyr	Ala	Ile	Thr	1160	Ser	Asp	Glu	Phe	Thr	Gly	Glu	Leu	Val
1155										1165					
ggt	gct	aaa	tca	cgt	aat	att	gca	tat	ctg	aaa	gga	aaa	gta	ccg	3808
Gly	Ala	Lys	Ser	Arg	Asn	1175	Ile	Ala	Tyr	Leu	Lys	Gly	Lys	Val	Pro
1170										1180					
tct	tgg	att	ggg	att	ccg	aca	tca	gtt	gcc	cta	cca	ttt	gga	gtg	3853
Ser	Trp	Ile	Gly	Ile	Pro	1190	Thr	Ser	Val	Ala	Leu	Pro	Phe	Gly	Val
1185										1195					
ttt	gag	aag	gtt	ctt	tca	gat	gac	ata	aat	cag	gca	gtg	gca	gag	3898
Phe	Glu	Lys	Val	Leu	Ser	1205	Asp	Asp	Ile	Asn	Gln	Ala	Val	Ala	Glut
1200										1210					
aag	ttg	caa	att	ttg	aaa	caa	aag	tta	gga	gag	gaa	gac	cat	agt	3943
Lys	Leu	Gln	Ile	Leu	Lys	1220	Gln	Lys	Leu	Gly	Glut	Glu	Asp	His	Ser
1215										1225					
gcc	ctt	agg	gag	att	cgg	gaa	aca	gtt	tta	cag	atg	aaa	gca	cca	3988
Ala	Leu	Arg	Glu	Ile	Arg	1235	Glu	Thr	Val	Leu	Gln	Met	Lys	Ala	Pro
1230										1240					
aac	cag	ttg	gtc	caa	gaa	ctg	aag	aca	gag	atg	aaa	agt	tct	ggt	4033
Asn	Gln	Leu	Val	Gln	Glut	1250	Leu	Lys	Thr	Glu	Met	Lys	Ser	Ser	Gly
1245										1255					
atg	cct	tgg	cct	ggt	gat	gaa	ggt	gag	cag	cgc	tgg	gag	caa	gca	4078
Met	Pro	Trp	Pro	Gly	Asp	1265	Glu	Gly	Glu	Gln	Arg	Trp	Glu	Gln	Ala
1260										1270					
tgg	atg	gct	atc	aag	aag	gtc	tgg	gct	tca	aaa	tgg	aat	gag	aga	4123
Trp	Met	Ala	Ile	Lys	Lys	1280	Val	Trp	Ala	Ser	Lys	Trp	Asn	Glut	Arg
1275										1285					
gca	tcc	tcc	agc	aca	agg	aga	gta	aaa	tta	gat	cat	gaa	tat	ctc	4168
Ala	Phe	Phe	Ser	Thr	Arg	1295	Arg	Val	Lys	Leu	Asp	His	Glu	Tyr	Leu
1290										1300					

BCS 04-5003_Erhöhte Akt. OK1 & R1_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

tgc	atg	gct	gtc	ctg	gtt	cag	gaa	ata	atc	aat	gct	gac	tat	gca	4213
Cys	Met	Ala	Val	Leu	Val	Gln	Glu	Ile	Ile	Asn	Ala	Asp	Tyr	Ala	
1305					1310					1315					
ttt	gtt	atc	cat	aca	act	aat	ccc	tct	tca	gga	gat	tca	tca	gaa	4258
Phe	Val	Ile	His	Thr	Thr	Asn	Pro	Ser	Ser	Gly	Asp	Ser	Ser	Glu	
1320					1325					1330					
ata	tat	gct	gag	gtg	gtg	aag	gga	ctt	gga	gaa	act	ctc	gtt	gga	4303
Ile	Tyr	Ala	Glu	Val	Val	Lys	Gly	Leu	Gly	Gl	Thr	Leu	Val	Gly	
1335					1340					1345					
gct	tat	cca	ggc	cgt	gct	ttg	agt	ttt	gtc	tgc	aag	aaa	aat	gat	4348
Ala	Tyr	Pro	Gly	Arg	Ala	Leu	Ser	Phe	Val	Cys	Lys	Lys	Asn	Asp	
1350					1355					1360					
ttg	aag	tct	cct	cg	gtt	ttg	ggt	tat	cca	agc	aag	ccc	att	ggg	4393
Leu	Lys	Ser	Pro	Arg	Val	Leu	Gly	Tyr	Pro	Ser	Lys	Pro	Ile	Gly	
1365					1370					1375					
ctt	ttt	ata	aga	cga	tca	atc	atc	ttc	cga	tct	gat	tcc	aat	ggt	4438
Leu	Phe	Ile	Arg	Arg	Ser	Ile	Ile	Phe	Arg	Ser	Asp	Ser	Asn	Gly	
1380					1385					1390					
gaa	gat	ctg	gaa	ggt	tat	gct	ggt	gct	ggc	ctt	tat	gat	agt	gtg	4483
Glu	Asp	Leu	Glu	Gly	Tyr	Ala	Gly	Ala	Gly	Leu	Tyr	Asp	Ser	Val	
1395					1400					1405					
cca	atg	gat	gaa	gcc	gag	aaa	gtt	gtg	ctt	gat	tac	tct	tca	gac	4528
Pro	Met	Asp	Glu	Ala	Glu	Lys	Val	Val	Leu	Asp	Tyr	Ser	Ser	Asp	
1410					1415					1420					
cat	ctg	atc	act	gac	gga	cac	ttc	cag	caa	tca	att	ctc	tct	tcc	4573
His	Leu	Ile	Thr	Asp	Gly	His	Phe	Gln	Gln	Ser	Ile	Leu	Ser	Ser	
1425					1430					1435					
att	gct	cgt	gca	gga	tgt	gag	att	gag	gag	cta	ttt	gga	tct	gca	4618
Ile	Ala	Arg	Ala	Gly	Cys	Gl	Ile	Glu	Gl	Leu	Phe	Gly	Ser	Ala	
1440					1445					1450					
caa	gac	att	gaa	ggt	gtg	gtt	agg	gat	ggg	aaa	ata	tat	gtt	gtc	4663
Gln	Asp	Ile	Glu	Gly	Val	Val	Arg	Asp	Gly	Lys	Ile	Tyr	Val	Val	
1455					1460					1465					
cag	aca	aga	ccc	caa	atg	tga	ggctgttctt	tttctttttt	attttttcct						4714
Gln	Thr	Arg	Pro	Gln	Met										
1470					1475										
gattggaaag ctattgataa aagcattata tcaatgaaaa aaattaaaaa gaaattatag															4774
aggtcaagcc tagaaaggag gaaaggggag tgagtattta tttggaaagca agtcaaataa															4834
aggtacaaaa ggagagagga ataaagtgc aatttcccg aacatgtaaa ttcaacttgg															4894
aattgtgtac tggatgctt gctctgtatg aagactaccg ggtcgaaatg acaacat															4954
tgtccatagg catgtaatgt tacatttgat tctggtaat accatacgct tcattatagg															5014
ggatcagcag atactatgtt gtatgtaaa tgtaatgtta taataaaaatg ttaatac															5074
tgttataaca tttgtattaa cctgtaacgt gaaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa															5124

<210> 7

<211> 1475

<212> PRT

<213> Citrus reticulata

<400> 7

Met	Ser	Asn	Ser	Ile	Gly	Arg	Asn	Val	Leu	His	Gln	Ser	Leu	Leu	Cys
1				5				10					15		

Ser	Thr	Val	Phe	Glu	His	Gln	Ser	Asn	Arg	His	Ser	Ser	Gly	Ile	Pro
			20				25						30		

Ala	Asn	Ser	Leu	Phe	Gln	Ala	Val	Ser	Ile	Asn	Gln	Pro	Ala	Gly	Ala
					35		40				45				

Ser	Ala	Ala	Arg	Lys	Ser	Pro	Leu	Ser	Thr	Lys	Phe	Tyr	Gly	Thr	Ser
					50					60					

Leu	Asn	Ala	Arg	Pro	Lys	Met	Ala	Met	Gly	Arg	His	Arg	Pro	Val	Leu
					65				75				80		

Ile	Thr	Pro	Arg	Ala	Val	Leu	Ala	Val	Asp	Ser	Ala	Ser	Glu	Leu	Ala
					85				90				95		

Gly	Lys	Phe	Asn	Leu	Glu	Gly	Asn	Val	Glu	Leu	Gln	Ile	Thr	Val	Gly
					100			105				110			

Ala	Pro	Thr	Pro	Gly	Ser	Leu	Thr	Gln	Val	Asn	Ile	Glu	Ile	Ser	Tyr
					115			120			125				

Ser	Ser	Asn	Ser	Leu	Leu	Leu	His	Trp	Gly	Ala	Ile	Arg	Asp	Lys	Lys
					130			135			140				

Glu	Lys	Trp	Val	Leu	Pro	Ser	Arg	Pro	Pro	Asp	Gly	Thr	Lys	Ile	Leu
					145				150			155		160	

Lys	Asn	Arg	Ala	Leu	Arg	Thr	Pro	Phe	Val	Ser	Ser	Gly	Ser	Lys	Ser
					165				170			175			

Leu	Val	Lys	Leu	Glu	Ile	Asp	Asp	Pro	Ala	Ile	Glu	Ala	Val	Glu	Phe
					180				185			190			

Leu	Ile	Leu	Asp	Glu	Ala	Gln	Asn	Lys	Trp	Phe	Lys	Asn	Asn	Gly	Ala
					195			200			205				

Asn	Phe	His	Val	Lys	Leu	Pro	Ser	Glu	Arg	Ser	Leu	Ile	Gln	Asn	Val
					210			215			220				

Ser	Val	Pro	Glu	Asp	Leu	Val	Gln	Thr	Gln	Ala	Tyr	Leu	Arg	Trp	Glu
					225				230			235		240	

BCS 04-5003_Erhöhte Akt. OK1 & R1_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

Arg Lys Gly Lys Gln Ile Tyr Thr Pro Glu Gln Glu Lys Glu Glu Tyr
245 250 255

Glu Ala Ala Arg Thr Glu Leu Leu Glu Glu Ile Val Arg Gly Thr Ser
260 265 270

Val Glu Asp Leu Arg Ala Lys Leu Thr Asn Lys Asn Asp Arg Gln Glu
275 280 285

Ile Lys Glu Ser Ser Ser His Gly Thr Lys Asn Ala Ile Pro Asp Asp
290 295 300

Leu Val Gln Ile Gln Ser Tyr Ile Arg Trp Glu Arg Ala Gly Lys Pro
305 310 315 320

Asn Tyr Ser Ala Asp Gln Gln Leu Arg Glu Phe Glu Glu Ala Arg Lys
325 330 335

Glu Leu Gln Ser Glu Leu Glu Lys Gly Ile Ser Leu Asp Glu Ile Trp
340 345 350

Lys Lys Ile Thr Lys Gly Glu Ile Gln Thr Lys Val Ser Asp Gln Leu
355 360 365

Lys Thr Lys Lys Tyr Phe Arg Thr Glu Arg Ile Gln Arg Lys Gln Arg
370 375 380

Asp Phe Met Gln Ile Leu Asn Lys His Val Ala Glu Pro Thr Glu Lys
385 390 395 400

Lys Asn Ile Ser Val Glu Pro Lys Ala Leu Thr Pro Val Glu Leu Phe
405 410 415

Val Gly Ala Thr Glu Glu Gln Glu Gly Asp Ser Ile Leu Asn Lys Lys
420 425 430

Ile Tyr Lys Leu Ala Gly Lys Glu Leu Leu Val Leu Val His Lys Pro
435 440 445

Gly Gly Lys Thr Lys Ile His Leu Ala Thr Asp Gly Lys Glu Pro Leu
450 455 460

Ile Leu His Trp Ala Leu Ser Lys Lys Ala Gly Glu Trp Leu Ala Pro
465 470 475 480

Pro Pro Ser Val Leu Pro Ala Gly Ser Val Leu Leu Ser Gly Ser Val
485 490 495

Glu Thr Thr Phe Thr Thr Ser Ser Leu Ala Asp Leu Pro Tyr Gln Val
500 505 510

BCS 04-5003_Erhöhte Akt. OK1 & R1_SEQUENZPROTOKOLL.ST25
Gln Ser Ile Glu Ile Glu Ile Glu Glu Gly Tyr Val Gly Met Pro
515 520 525

Ser Val Leu Gln Ser Gly Gly Asn Trp Ile Lys Asn Lys Gly Ser Asp
530 535 540

Phe Tyr Val Asp Phe Ser Tyr Glu Ser Lys Gln Val Gln Gln Asp Phe
545 550 555 560

Gly Asp Gly Lys Gly Thr Ala Lys Ala Leu Leu Glu Lys Ile Ala Gly
565 570 575

Leu Glu Ile Glu Ala Gln Lys Ser Phe Met His Arg Phe Asn Ile Ala
580 585 590

Ala Asp Leu Ile Gln Glu Ala Lys Glu Ala Gly Glu Leu Gly Phe Ala
595 600 605

Gly Ile Leu Val Trp Met Arg Phe Met Ala Thr Arg Gln Leu Ile Trp
610 615 620

Asn Lys Asn Tyr Asn Val Lys Pro Arg Glu Ile Ser Lys Ala Gln Asp
625 630 635 640

Arg Leu Thr Asp Leu Leu Gln Asn Val Tyr Ile Ser Asn Pro Glu Tyr
645 650 655

Arg Glu Ile Val Arg Met Ile Leu Ser Thr Val Gly Arg Gly Glu
660 665 670

Gly Asp Val Gly Gln Arg Ile Arg Asp Glu Ile Leu Val Ile Gln Arg
675 680 685

Asn Asn Asn Cys Lys Gly Gly Met Met Glu Glu Trp His Gln Lys Leu
690 695 700

His Asn Asn Thr Ser Pro Asp Asp Val Ile Ile Cys Gln Ala Leu Ile
705 710 715 720

Asp Tyr Ile Lys Ser Asp Phe Asp Ile Ser Ala Tyr Trp Lys Thr Leu
725 730 735

Asn Asp Asn Gly Ile Thr Lys Glu Arg Leu Leu Ser Tyr Asp Arg Ala
740 745 750

Ile His Ser Glu Pro Asn Phe Arg Arg Asp Gln Lys Asp Gly Leu Leu
755 760 765

Arg Asp Leu Gly Asn Tyr Met Arg Thr Leu Lys Ala Val His Ser Gly
770 775 780

BCS 04-5003_Erhöhte Akt. OK1 & R1_SEQUENZPROTOKOLL_ST25
Ala Asp Leu Glu Ser Ala Ile Thr Asn Cys Leu Gly Tyr Arg Ser Glu
785 790 795 800

Gly Gln Gly Phe Met Val Gly Val Gln Ile Asn Pro Ile Pro Asn Leu
805 810 815

Pro Ser Gly Phe Pro Glu Leu Leu Gln Phe Val Ser Glu His Val Glu
820 825 830

Asp Arg Asn Val Glu Ala Leu Leu Glu Gly Leu Leu Glu Ala Arg Gln
835 840 845

Glu Ile Arg Pro Leu Leu Cys Lys His Asn Asp Arg Leu Lys Asp Leu
850 855 860

Leu Phe Leu Asp Ile Ala Leu Glu Ser Ser Val Arg Thr Ala Ile Glu
865 870 875 880

Lys Gly Tyr Glu Glu Leu Asn Glu Ala Gly Pro Glu Lys Ile Met Tyr
885 890 895

Phe Val Ser Leu Ile Leu Glu Asn Leu Ala Leu Ser Leu Asp Asp Asn
900 905 910

Glu Asp Leu Ile Tyr Cys Leu Lys Gly Trp Ser Asn Ala Leu Ser Met
915 920 925

Ser Lys Ser Lys Ser Asp Asn Trp Ala Leu Phe Ala Lys Ser Val Leu
930 935 940

Asp Arg Thr Arg Leu Ala Leu Ala Gly Lys Ala Asp Trp Tyr Gln Lys
945 950 955 960

Val Leu Gln Pro Ser Ala Glu Tyr Leu Gly Thr Leu Leu Ser Val Asp
965 970 975

Lys Trp Ala Val Asp Ile Phe Thr Glu Glu Met Ile Arg Ala Gly Ser
980 985 990

Ala Ala Ala Leu Ser Leu Leu Leu Asn Arg Leu Asp Pro Val Leu Arg
995 1000 1005

Lys Thr Ala Ser Leu Gly Ser Trp Gln Val Ile Ser Pro Val Glu
1010 1015 1020

Val Phe Gly Tyr Val Ala Val Val Asp Glu Leu Leu Ala Val Gln
1025 1030 1035

Asp Lys Ser Tyr Asp Gln Pro Thr Ile Leu Leu Ala Arg Arg Val
1040 1045 1050

Lys Gly Glu Glu Glu Ile Pro His Gly Thr Val Ala Val Leu Thr
 1055 1060 1065

Ala Asp Met Pro Asp Val Leu Ser His Val Ser Val Arg Ala Arg
 1070 1075 1080

Asn Cys Lys Val Cys Phe Ala Thr Cys Phe Asp Pro Asn Ile Leu
 1085 1090 1095

Ala Asp Leu Gln Ser Asn Glu Gly Lys Met Leu His Leu Lys Pro
 1100 1105 1110

Thr Ser Ala Asp Ile Ala Tyr Ser Val Val Glu Gly Ser Glu Leu
 1115 1120 1125

Gln Asp Ser Ser Ser Ala Asn Leu Lys Glu Glu Asp Gly Pro Ser
 1130 1135 1140

Ser Ser Val Ala Leu Val Lys Lys Gln Phe Ala Gly Arg Tyr Ala
 1145 1150 1155

Ile Thr Ser Asp Glu Phe Thr Gly Glu Leu Val Gly Ala Lys Ser
 1160 1165 1170

Arg Asn Ile Ala Tyr Leu Lys Gly Lys Val Pro Ser Trp Ile Gly
 1175 1180 1185

Ile Pro Thr Ser Val Ala Leu Pro Phe Gly Val Phe Glu Lys Val
 1190 1195 1200

Leu Ser Asp Asp Ile Asn Gln Ala Val Ala Glu Lys Leu Gln Ile
 1205 1210 1215

Leu Lys Gln Lys Leu Gly Glu Glu Asp His Ser Ala Leu Arg Glu
 1220 1225 1230

Ile Arg Glu Thr Val Leu Gln Met Lys Ala Pro Asn Gln Leu Val
 1235 1240 1245

Gln Glu Leu Lys Thr Glu Met Lys Ser Ser Gly Met Pro Trp Pro
 1250 1255 1260

Gly Asp Glu Gly Glu Gln Arg Trp Glu Gln Ala Trp Met Ala Ile
 1265 1270 1275

Lys Lys Val Trp Ala Ser Lys Trp Asn Glu Arg Ala Phe Phe Ser
 1280 1285 1290

Thr Arg Arg Val Lys Leu Asp His Glu Tyr Leu Cys Met Ala Val
 1295 1300 1305

BCS 04-5003_Erhöhte Akt. OK1 & R1_SEQUENZPROTOKOLL.ST25
Leu Val Gln Glu Ile Ile Asn Ala Asp Tyr Ala Phe Val Ile His
1310 1315 1320

Thr Thr Asn Pro Ser Ser Gly Asp Ser Ser Glu Ile Tyr Ala Glu
1325 1330 1335

Val Val Lys Gly Leu Gly Glu Thr Leu Val Gly Ala Tyr Pro Gly
1340 1345 1350

Arg Ala Leu Ser Phe Val Cys Lys Lys Asn Asp Leu Lys Ser Pro
1355 1360 1365

Arg Val Leu Gly Tyr Pro Ser Lys Pro Ile Gly Leu Phe Ile Arg
1370 1375 1380

Arg Ser Ile Ile Phe Arg Ser Asp Ser Asn Gly Glu Asp Leu Glu
1385 1390 1395

Gly Tyr Ala Gly Ala Gly Leu Tyr Asp Ser Val Pro Met Asp Glu
1400 1405 1410

Ala Glu Lys Val Val Leu Asp Tyr Ser Ser Asp His Leu Ile Thr
1415 1420 1425

Asp Gly His Phe Gln Gln Ser Ile Leu Ser Ser Ile Ala Arg Ala
1430 1435 1440

Gly Cys Glu Ile Glu Glu Leu Phe Gly Ser Ala Gln Asp Ile Glu
1445 1450 1455

Gly Val Val Arg Asp Gly Lys Ile Tyr Val Val Gln Thr Arg Pro
1460 1465 1470

Gln Met
1475

<210> 8
<211> 4200
<212> DNA
<213> *Arabidopsis thaliana*

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(4200)
<223>

BCS 04-5003_Erhöhte Akt. OK1 & R1_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

<300>

<308> EMBL / AF312027

<309> 2001-01-08

<400>	8																
atg	agt	aac	tct	gta	gtg	cat	aac	tta	ctt	aac	cg	ggt	ttg	att	cgt		48
Met	Ser	Asn	Ser	Val	Val	His	Asn	Leu	Leu	Asn	Arg	Gly	Leu	Ile	Arg		
1				5					10					15			
cct	ctt	aac	ttt	gaa	cat	caa	aac	aag	ctc	aac	tcc	tct	gtg	tac	caa		96
Pro	Leu	Asn	Phe	Glu	His	Gln	Asn	Lys	Leu	Asn	Ser	Ser	Val	Tyr	Gln		
				20				25					30				
act	tca	aca	gca	aat	ccg	gct	ctt	ggc	aag	att	ggc	aga	tca	aaa	ctt		144
Thr	Ser	Thr	Ala	Asn	Pro	Ala	Leu	Gly	Lys	Ile	Gly	Arg	Ser	Lys	Leu		
				35			40			45							
tac	ggg	aaa	ggt	ctt	aag	cag	gca	gga	cgc	agt	ctg	gtc	act	gaa	aca		192
Tyr	Gly	Lys	Gly	Leu	Lys	Gln	Ala	Gly	Arg	Ser	Leu	Val	Thr	Glu	Thr		
	50			55				60									
gga	gga	aga	cct	ctc	tca	ttt	gtt	cca	cga	gct	gtc	ctt	gcc	atg	gat		240
Gly	Gly	Arg	Pro	Leu	Ser	Phe	Val	Pro	Arg	Ala	Val	Leu	Ala	Met	Asp		
	65			70				75					80				
cct	cag	gca	gcc	gag	aaa	ttt	agt	ctt	gac	gga	aat	atc	gat	tta	ctg		288
Pro	Gln	Ala	Ala	Glu	Lys	Phe	Ser	Leu	Asp	Gly	Asn	Ile	Asp	Leu	Leu		
				85			90					95					
gtt	gaa	gtc	act	tct	aca	act	gta	aga	gaa	gta	aat	atc	cag	ata	gct		336
Val	Glu	Val	Thr	Ser	Thr	Thr	Val	Arg	Glu	Val	Asn	Ile	Gln	Ile	Ala		
	100				105				110								
tat	aca	agt	gac	aca	ttg	ttc	cta	cac	tgg	ggt	gca	att	ctt	gac	aac		384
Tyr	Thr	Ser	Asp	Thr	Leu	Phe	Leu	His	Trp	Gly	Ala	Ile	Leu	Asp	Asn		
	115				120		125										
aaa	gaa	aat	tgg	gtt	cta	cct	tct	cgc	tct	ccg	gat	aga	act	caa	aac		432
Lys	Glu	Asn	Trp	Val	Leu	Pro	Ser	Arg	Ser	Pro	Asp	Arg	Thr	Gln	Asn		
	130				135				140								
ttc	aag	aac	agt	gcg	ctt	aga	act	cca	ttt	gtg	aaa	tcc	ggt	ggc	aat		480
Phe	Lys	Asn	Ser	Ala	Leu	Arg	Thr	Pro	Phe	Val	Lys	Ser	Gly	Gly	Asn		
	145				150			155		160							
tct	cac	ctt	aaa	cta	gag	ata	gat	gat	cct	gcc	ata	cac	gct	att	gag		528
Ser	His	Leu	Lys	Leu	Glu	Ile	Asp	Asp	Pro	Ala	Ile	His	Ala	Ile	Glu		
				165			170					175					
ttc	ctt	ata	ttt	gac	gaa	agt	cg	aa	aaa	tgg	tat	aaa	aat	aat	ggt		576
Phe	Leu	Ile	Phe	Asp	Glu	Ser	Arg	Asn	Lys	Trp	Tyr	Lys	Asn	Asn	Gly		
	180			185					190								
cag	aat	ttt	cat	ata	aac	tta	cca	acg	gaa	agg	aat	gtg	aaa	caa	aat		624
Gln	Asn	Phe	His	Ile	Asn	Leu	Pro	Thr	Glu	Arg	Asn	Val	Lys	Gln	Asn		
	195				200				205								
gtt	tct	gtt	cct	gaa	gat	ctt	gta	cag	atc	caa	gca	tat	ctt	aga	tgg		672
Val	Ser	Val	Pro	Glu	Asp	Leu	Val	Gln	Ile	Gln	Ala	Tyr	Leu	Arg	Trp		
	210			215				220									
gaa	cgt	aag	ggt	aaa	caa	atg	tac	aac	cct	gag	aaa	gag	aag	gag	gag		720
Glu	Arg	Lys	Gly	Lys	Gln	Met	Tyr	Asn	Pro	Glu	Lys	Glu	Lys	Glu	Glu		
	225				230			235		240							

BCS 04-5003_Erhöhte Akt. OK1 & R1_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

tat	gaa	gcc	gcc	cg	ac	gag	cta	cg	gag	gaa	atg	atg	cga	ggt	gct	768	
Tyr	Glu	Ala	Ala	Arg	Thr	Glu	Leu	Arg	Glu	Glu	Met	Met	Arg	Gly	Ala		
245									250						255		
tca	gtg	gaa	gat	ctc	aga	gca	aag	ctg	ttg	aag	aaa	gat	aac	agt	aat	816	
Ser	Val	Glu	Asp	Leu	Arg	Ala	Lys	Leu	Leu	Lys	Lys	Asp	Asn	Ser	Asn		
260								265						270			
gaa	tcc	cca	aaa	tct	aat	ggg	aca	tca	tcc	agt	gga	cg	gag	gaa	aag	864	
Glu	Ser	Pro	Lys	Ser	Asn	Gly	Thr	Ser	Ser	Ser	Gly	Arg	Glu	Glu	Lys		
275							280				285						
aaa	aaa	gtt	tcc	aag	caa	cca	gag	cgt	aaa	aaa	aat	tat	aac	act	gac	912	
Lys	Lys	Val	Ser	Lys	Gln	Pro	Glu	Arg	Lys	Lys	Asn	Tyr	Asn	Thr	Asp		
290						295					300						
aag	atc	cag	cgc	aag	gga	agg	gac	ctg	act	aag	ctt	atc	tat	aag	cat	960	
Lys	Ile	Gln	Arg	Lys	Gly	Arg	Asp	Leu	Thr	Lys	Leu	Ile	Tyr	Lys	His		
305					310				315					320			
gtt	gct	gat	ttt	gtt	gaa	cca	gaa	tcc	aaa	tcc	tca	tct	gaa	cca	cg	1008	
Val	Ala	Asp	Phe	Val	Glu	Pro	Glu	Ser	Lys	Ser	Ser	Gl	Pro	Arg			
325						330						335					
tcc	tta	aca	act	ctg	gag	ata	ta	g	cc	aaa	gca	aag	gag	gaa	caa	1056	
Ser	Leu	Thr	Thr	Leu	Glu	Ile	Tyr	Ala	Lys	Ala	Lys	Gl	Gl	Gln	Glu		
340						345						350					
acc	act	cca	gtc	ttt	agc	aag	aaa	aca	tcc	aag	ctt	gaa	gg	agt	gc	1104	
Thr	Thr	Pro	Val	Phe	Ser	Lys	Lys	Thr	Phe	Lys	Leu	Gl	Gly	Ser	Ala		
355						360						365					
att	ttg	gtg	ttt	gtt	act	aaa	ctt	tcc	gga	aag	acg	aaa	att	cat	gt	1152	
Ile	Leu	Val	Phe	Val	Thr	Lys	Leu	Ser	Gly	Lys	Thr	Lys	Ile	His	Val		
370						375						380					
gca	act	gat	ttt	aaa	gag	ccg	gtt	acc	ctt	cac	tgg	gct	ttg	tct	caa	1200	
Ala	Thr	Asp	Phe	Lys	Gl	Pro	Val	Thr	Leu	His	Trp	Ala	Leu	Ser	Gln		
385						390				395				400			
aag	ggt	gga	gaa	tgg	ttg	gac	cca	cct	tca	gat	ata	ctg	cca	cca	aac	1248	
Lys	Gly	Gly	Glu	Trp	Leu	Asp	Pro	Pro	Ser	Asp	Ile	Leu	Pro	Pro	Asn		
405									410					415			
tct	ttg	cca	gta	cgt	ggt	gct	gtt	gat	aca	aaa	ctg	acc	atc	act	tca	1296	
Ser	Leu	Pro	Val	Arg	Gly	Ala	Val	Asp	Thr	Lys	Leu	Thr	Ile	Thr	Ser		
420								425					430				
aca	gat	ctt	cct	agt	ccg	gtt	caa	act	ttt	gag	ctg	gaa	ata	gaa	ggt	1344	
Thr	Asp	Leu	Pro	Ser	Pro	Val	Gln	Thr	Phe	Gl	Leu	Gl	Ile	Glu	Gly		
435								440						445			
gac	agc	tac	aag	ggc	atg	ccg	ttt	gta	ctc	aat	gct	ggt	gaa	agg	tgg	1392	
Asp	Ser	Tyr	Lys	Gly	Met	Pro	Phe	Val	Leu	Asn	Ala	Gly	Gl	Arg	Trp		
450								455						460			
att	aaa	aat	aat	gac	agt	gac	ttt	ta	gt	gac	ttt	gct	aaa	gaa	gaa	1440	
Ile	Lys	Asn	Asn	Asp	Ser	Asp	Phe	Tyr	Val	Asp	Phe	Ala	Lys	Glu	Glu		
465								470				475			480		
aaa	cat	gtt	cag	aag	gat	ta	ttt	g	g	g	aag	ggt	aca	gcc	aag	cat	1488
Lys	His	Val	Gln	Lys	Asp	Tyr	Gly	Asp	Gly	Lys	Gly	Thr	Ala	Lys	His		
485								490						495			
tta	ctg	gac	aaa	atc	gca	gat	ttg	gag	agt	gag	gcc	cag	aag	tct	tcc	1536	
Leu	Leu	Asp	Lys	Ile	Ala	Asp	Leu	Glu	Ser	Gl	Ala	Gln	Lys	Ser	Phe		
500								505						510			

BCS 04-5003_Erhöhte Akt. OK1 & R1_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

atg cat cga ttc aac att gca gca gat ctt gtg gac gag gca aaa agt Met His Arg Phe Asn Ile Ala Ala Asp Leu Val Asp Glu Ala Lys Ser 515 520 525	1584
gct ggt caa ctg ggc ttt gca ggg atc cta gtc tgg atg agg ttt atg Ala Gly Gln Leu Gly Phe Ala Gly Ile Leu Val Trp Met Arg Phe Met 530 535 540	1632
gct aca aga cag ctt gtg tgg aac aaa aac tat aat gtt aag cca agg Ala Thr Arg Gln Leu Val Trp Asn Lys Asn Tyr Asn Val Lys Pro Arg 545 550 555 560	1680
gag ata agc aaa gcg cag gat aga ctg act gac ctt ctc cag gac gtt Glu Ile Ser Lys Ala Gln Asp Arg Leu Thr Asp Leu Leu Gln Asp Val 565 570 575	1728
tat gca agt tat cca gag tac aga gaa ctt ttg cgg atg ata atg tct Tyr Ala Ser Tyr Pro Glu Tyr Arg Glu Leu Leu Arg Met Ile Met Ser 580 585 590	1776
act gta ggt cga gga ggt gaa gga gat gtc ggg caa cga atc cgt gac Thr Val Gly Arg Gly Glu Gly Asp Val Gly Gln Arg Ile Arg Asp 595 600 605	1824
gaa att cta gtc atc cag cgg aaa aat gac tgc aag ggt gga att atg Glu Ile Leu Val Ile Gln Arg Lys Asn Asp Cys Lys Gly Gly Ile Met 610 615 620	1872
gag gaa tgg cat cag aag ttg cat aac aac act agt cca gat gat gtt Glu Glu Trp His Gln Lys Leu His Asn Asn Thr Ser Pro Asp Asp Val 625 630 635 640	1920
gtc atc tgt cag gca ttg atg gat tat atc aaa agt gac ttt gac tta Val Ile Cys Gln Ala Leu Met Asp Tyr Ile Lys Ser Asp Phe Asp Leu 645 650 655	1968
agt gtt tac tgg aag acc ttg aac gat aat ggc ata acc aaa gag cga Ser Val Tyr Trp Lys Thr Leu Asn Asp Asn Gly Ile Thr Lys Glu Arg 660 665 670	2016
ctc tta agt tat gat cgt gct ata cat tct gaa cca aat ttt aga gga Leu Leu Ser Tyr Asp Arg Ala Ile His Ser Glu Pro Asn Phe Arg Gly 675 680 685	2064
gaa caa aaa gac ggt ctt ttg cgt gat ctt gga cac tac atg agg act Glu Gln Lys Asp Gly Leu Leu Arg Asp Leu Gly His Tyr Met Arg Thr 690 695 700	2112
tta aag gct gtt cat tca ggg gca gac ctt gag tcg gct ata caa aat Leu Lys Ala Val His Ser Gly Ala Asp Leu Glu Ser Ala Ile Gln Asn 705 710 715 720	2160
tgc atg ggc tac caa gat gac ggt gaa ggt ttc atg gtt ggg gtg cag Cys Met Gly Tyr Gln Asp Asp Gly Glu Gly Phe Met Val Gly Val Gln 725 730 735	2208
ata aat cct gta tca gga ttg cct tct gga tat cca gac ttg ctt cgt Ile Asn Pro Val Ser Gly Leu Pro Ser Gly Tyr Pro Asp Leu Leu Arg 740 745 750	2256
ttc gtc cta gaa cat gtt gaa gaa aag aat gta gag cca ctt ctt gag Phe Val Leu Glu His Val Glu Glu Lys Asn Val Glu Pro Leu Leu Glu 755 760 765	2304
ggt ttg ctt gaa gct cgt caa gag cta agg cca ctt ctg ctg aag tcc Gly Leu Leu Glu Ala Arg Gln Glu Leu Arg Pro Leu Leu Leu Lys Ser 770 775 780	2352

BCS 04-5003_Erhöhte Akt. OK1 & R1_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

cat gac cgc ctc aag gat ctg tta ttc ttg gac ctc gct ctt gat tct	2400
His Asp Arg Leu Lys Asp Leu Leu Phe Leu Asp Leu Ala Leu Asp Ser	
785 790 795 800	
act gtc aga aca gcg att gaa aga gga tat gag caa ttg aat gat gct	2448
Thr Val Arg Thr Ala Ile Glu Arg Gly Tyr Glu Gln Leu Asn Asp Ala	
805 810 815	
gga cct gag aaa atc atg tac ttc atc agc cta gtt ctt gaa aat ctt	2496
Gly Pro Glu Lys Ile Met Tyr Phe Ile Ser Leu Val Leu Glu Asn Leu	
820 825 830	
gcc ctc tct tca gat gac aat gaa gac ctt ata tac tgc ttg aag gga	2544
Ala Leu Ser Ser Asp Asp Asn Glu Asp Leu Ile Tyr Cys Leu Lys Gly	
835 840 845	
tgg caa ttt gcc ctc gac atg tgc aag agc aaa aat gat cac tgg gct	2592
Trp Gln Phe Ala Leu Asp Met Cys Lys Ser Lys Lys Asp His Trp Ala	
850 855 860	
ctg tat gca aaa tct gtt ctt gac aga agc cga cta gca ctg gca agc	2640
Leu Tyr Ala Lys Ser Val Leu Asp Arg Ser Arg Leu Ala Leu Ala Ser	
865 870 875 880	
aaa gct gag agg tac ctt gaa att ctg caa cca tcg gct gaa tat ctt	2688
Lys Ala Glu Arg Tyr Leu Glu Ile Leu Gln Pro Ser Ala Glu Tyr Leu	
885 890 895	
gga tct tgt ctt gga gtc gat cag tcg gct gtt agt ata ttt act gaa	2736
Gly Ser Cys Leu Gly Val Asp Gln Ser Ala Val Ser Ile Phe Thr Glu	
900 905 910	
gag atc att cga gct gga tct gca gca gca ttg tcg tca ctt gtt aac	2784
Glu Ile Ile Arg Ala Gly Ser Ala Ala Ala Leu Ser Ser Leu Val Asn	
915 920 925	
cga ctt gac cca gtt ctt agg aag act gct aac ttg gga agt tgg cag	2832
Arg Leu Asp Pro Val Leu Arg Lys Thr Ala Asn Leu Gly Ser Trp Gln	
930 935 940	
gtt att agt cct gta gag gtc gtc gga tat gtc att gtt gtg gac gaa	2880
Val Ile Ser Pro Val Glu Val Val Gly Tyr Val Ile Val Val Asp Glu	
945 950 955 960	
ttg ctc act gta cag aat aaa acc tac gat aga cct aca att ata gtt	2928
Leu Leu Thr Val Gln Asn Lys Thr Tyr Asp Arg Pro Thr Ile Ile Val	
965 970 975	
gca aac aga gtg aga gga gag gag gaa atc cct gat ggt gca gtt gcg	2976
Ala Asn Arg Val Arg Gly Glu Glu Ile Pro Asp Gly Ala Val Ala	
980 985 990 995	
gta ctg aca cct gac atg ccg gat gta cta tct cat gtt tct gtt cga	3024
Val Leu Thr Pro Asp Met Pro Asp Val Leu Ser His Val Ser Val Arg	
995 1000 1005	
gca aga aat gga aag atc tgc ttt gcc aca tgt ttt gat tct ggt	3069
Ala Arg Asn Gly Lys Ile Cys Phe Ala Thr Cys Phe Asp Ser Gly	
1010 1015 1020	
atc tta tct gac ctc caa gga aaa gat gga aaa ctg ttg agc cta	3114
Ile Leu Ser Asp Leu Gln Gly Lys Asp Gly Lys Leu Leu Ser Leu	
1025 1030 1035	
caa cca acc tct gca gat gta gtc tat aaa gag gta aac gat agt	3159
Gln Pro Thr Ser Ala Asp Val Val Tyr Lys Glu Val Asn Asp Ser	
1040 1045 1050	

BCS 04-5003_Erhöhte Akt. OK1 & R1_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

gag	ctt	tcg	agt	cca	agt	tca	gac	aac	ctg	gaa	gat	gcc	cct	cca	3204
Glu	Leu	Ser	Ser	Pro	Ser	Ser	Asp	Asn	Leu	Glu	Asp	Ala	Pro	Pro	
1055						1060					1065				
agt	att	tct	ttg	gtc	aag	aaa	cag	ttt	gct	ggt	aga	tat	gct	ata	3249
Ser	Ile	Ser	Leu	Val	Lys	Lys	Gln	Phe	Ala	Gly	Arg	Tyr	Ala	Ile	
1070						1075					1080				
tca	tct	gag	gag	tcc	aca	agt	gac	ttg	gtt	ggt	gct	aaa	tca	aga	3294
Ser	Ser	Glu	Glu	Phe	Thr	Ser	Asp	Leu	Val	Gly	Ala	Lys	Ser	Arg	
1085						1090					1095				
aat	atc	ggg	tat	ctg	aaa	gga	aaa	gtt	cct	tct	tgg	gtt	ggt	atc	3339
Asn	Ile	Gly	Tyr	Leu	Lys	Gly	Lys	Val	Pro	Ser	Trp	Val	Gly	Ile	
1100						1105					1110				
cca	act	tca	gtt	gcg	ttg	cca	ttt	ggt	gtt	ttt	gag	aag	gtt	atc	3384
Pro	Thr	Ser	Val	Ala	Leu	Pro	Phe	Gly	Val	Phe	Gl	Lys	Val	Ile	
1115						1120					1125				
tcc	gaa	aag	gcg	aat	cag	gcg	gtg	aac	gat	aaa	ttg	cta	gta	ttg	3429
Ser	Glu	Lys	Ala	Asn	Gln	Ala	Val	Asn	Asp	Lys	Leu	Leu	Val	Leu	
1130						1135					1140				
aag	aaa	act	ctt	gat	gag	gga	gac	caa	ggt	gct	ctg	aag	gaa	atc	3474
Lys	Lys	Thr	Leu	Asp	Glu	Gly	Asp	Gln	Gly	Ala	Leu	Lys	Glu	Ile	
1145						1150					1155				
cgg	cag	aca	ctg	ttg	ggg	cta	gtt	gca	ccc	cca	gaa	ctg	gtt	gaa	3519
Arg	Gln	Thr	Leu	Leu	Gly	Leu	Val	Ala	Pro	Pro	Gl	Leu	Val	Glu	
1160						1165					1170				
gaa	ctg	aaa	agt	act	atg	aaa	agt	tct	gac	atg	cca	tgg	ccg	ggt	3564
Glu	Leu	Lys	Ser	Thr	Met	Lys	Ser	Ser	Asp	Met	Pro	Trp	Pro	Gly	
1175						1180					1185				
gat	gaa	ggt	gaa	cag	aga	tgg	gag	caa	gct	tgg	gca	gcc	att	aaa	3609
Asp	Glu	Gly	Glu	Gln	Arg	Trp	Gl	Gln	Ala	Trp	Ala	Ala	Ile	Lys	
1190						1195					1200				
aag	gtc	tgg	gct	tcg	aaa	tgg	aac	gag	aga	gca	tac	tcc	agc	acg	3654
Lys	Val	Trp	Ala	Ser	Lys	Trp	Asn	Glu	Arg	Ala	Tyr	Phe	Ser	Thr	
1205						1210					1215				
agg	aaa	gta	aaa	ctg	gat	cat	gac	tat	ctc	tgc	atg	gct	gtt	ttg	3699
Arg	Lys	Val	Lys	Leu	Asp	His	Asp	Tyr	Leu	Cys	Met	Ala	Val	Leu	
1220						1225					1230				
gtc	caa	gaa	gtc	atc	aat	gcg	gat	tac	gca	ttc	gtc	att	cac	aca	3744
Val	Gln	Glu	Val	Ile	Asn	Ala	Asp	Tyr	Ala	Phe	Val	Ile	His	Thr	
1235						1240					1245				
act	aat	cca	tct	tct	gga	gat	tca	tca	gag	att	tat	gcc	gag	gtg	3789
Thr	Asn	Pro	Ser	Ser	Gly	Asp	Ser	Ser	Glu	Ile	Tyr	Ala	Glu	Val	
1250						1255					1260				
gtc	aaa	ggc	ctt	ggg	gaa	act	ctt	gta	gga	gca	tat	ccc	ggt	cg	3834
Val	Lys	Gly	Leu	Gly	Glu	Thr	Leu	Val	Gly	Ala	Tyr	Pro	Gly	Arg	
1265						1270					1275				
tct	ctg	agt	ttc	atc	tgc	aag	aaa	aac	aac	ctt	gat	tcg	cct	ctg	3879
Ser	Leu	Ser	Phe	Ile	Cys	Lys	Lys	Asn	Asn	Leu	Asp	Ser	Pro	Leu	
1280						1285					1290				
gtg	ttg	ggc	tac	cca	agc	aaa	ccg	att	ggg	ctg	ttc	ata	aga	cgt	3924
Val	Leu	Gly	Tyr	Pro	Ser	Lys	Pro	Ile	Gly	Leu	Phe	Ile	Arg	Arg	
1295						1300					1305				

BCS 04-5003_Erhöhte Akt. OK1 & R1_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

tca	atc	atc	ttc	aga	tct	gat	tcc	aat	gga	gaa	gat	ctt	gaa	ggt	3969
Ser	Ile	Ile	Phe	Arg	Ser	Asp	Ser	Asn	Gly	Glu	Asp	Leu	Glu	Gly	
1310					1315						1320				
tat	gca	ggt	gca	ggc	ctc	tac	gac	agt	gta	cca	atg	gac	gag	gaa	4014
Tyr	Ala	Gly	Ala	Gly	Leu	Tyr	Asp	Ser	Val	Pro	Met	Asp	Glu	Glu	
1325					1330						1335				
gac	caa	gtc	gtg	ctc	gat	tac	aca	aca	gat	cct	ctg	atc	act	gac	4059
Asp	Gln	Val	Val	Leu	Asp	Tyr	Thr	Thr	Asp	Pro	Leu	Ile	Thr	Asp	
1340					1345						1350				
ttg	agc	ttc	cag	aaa	aag	gtt	ctc	tca	gac	att	gca	cgc	gct	gga	4104
Leu	Ser	Phe	Gln	Lys	Lys	Val	Leu	Ser	Asp	Ile	Ala	Arg	Ala	Gly	
1355					1360						1365				
gat	gcc	att	gag	aaa	ctc	tat	gga	act	gca	cag	gac	att	gaa	ggt	4149
Asp	Ala	Ile	Glu	Lys	Leu	Tyr	Gly	Thr	Ala	Gln	Asp	Ile	Glu	Gly	
1370					1375						1380				
gtg	atc	aga	gac	ggg	aag	ctc	tat	gtc	gtc	cag	aca	cga	cca	caa	4194
Val	Ile	Arg	Asp	Gly	Lys	Leu	Tyr	Val	Val	Gln	Thr	Arg	Pro	Gln	
1385					1390						1395				
gtg	tga														4200
Val															

<210> 9

<211> 1399

<212> PRT

<213> *Arabidopsis thaliana*

<400> 9

Met Ser Asn Ser Val Val His Asn Leu Leu Asn Arg Gly Leu Ile Arg
1 5 10 15

Pro Leu Asn Phe Glu His Gln Asn Lys Leu Asn Ser Ser Val Tyr Gln
20 25 30

Thr Ser Thr Ala Asn Pro Ala Leu Gly Lys Ile Gly Arg Ser Lys Leu
35 40 45

Tyr Gly Lys Gly Leu Lys Gln Ala Gly Arg Ser Leu Val Thr Glu Thr
50 55 60

Gly Gly Arg Pro Leu Ser Phe Val Pro Arg Ala Val Leu Ala Met Asp
65 70 75 80

Pro Gln Ala Ala Glu Lys Phe Ser Leu Asp Gly Asn Ile Asp Leu Leu
85 90 95

Val Glu Val Thr Ser Thr Thr Val Arg Glu Val Asn Ile Gln Ile Ala
100 105 110

BCS 04-5003_Erhöhte Akt. OK1 & R1_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

Tyr Thr Ser Asp Thr Leu Phe Leu His Trp Gly Ala Ile Leu Asp Asn
115 120 125

Lys Glu Asn Trp Val Leu Pro Ser Arg Ser Pro Asp Arg Thr Gln Asn
130 135 140

Phe Lys Asn Ser Ala Leu Arg Thr Pro Phe Val Lys Ser Gly Gly Asn
145 150 155 160

Ser His Leu Lys Leu Glu Ile Asp Asp Pro Ala Ile His Ala Ile Glu
165 170 175

Phe Leu Ile Phe Asp Glu Ser Arg Asn Lys Trp Tyr Lys Asn Asn Gly
180 185 190

Gln Asn Phe His Ile Asn Leu Pro Thr Glu Arg Asn Val Lys Gln Asn
195 200 205

Val Ser Val Pro Glu Asp Leu Val Gln Ile Gln Ala Tyr Leu Arg Trp
210 215 220

Glu Arg Lys Gly Lys Gln Met Tyr Asn Pro Glu Lys Glu Lys Glu Glu
225 230 235 240

Tyr Glu Ala Ala Arg Thr Glu Leu Arg Glu Glu Met Met Arg Gly Ala
245 250 255

Ser Val Glu Asp Leu Arg Ala Lys Leu Leu Lys Lys Asp Asn Ser Asn
260 265 270

Glu Ser Pro Lys Ser Asn Gly Thr Ser Ser Ser Gly Arg Glu Glu Lys
275 280 285

Lys Lys Val Ser Lys Gln Pro Glu Arg Lys Lys Asn Tyr Asn Thr Asp
290 295 300

Lys Ile Gln Arg Lys Gly Arg Asp Leu Thr Lys Leu Ile Tyr Lys His
305 310 315 320

Val Ala Asp Phe Val Glu Pro Glu Ser Lys Ser Ser Ser Glu Pro Arg
325 330 335

Ser Leu Thr Thr Leu Glu Ile Tyr Ala Lys Ala Lys Glu Glu Gln Glu
340 345 350

Thr Thr Pro Val Phe Ser Lys Lys Thr Phe Lys Leu Glu Gly Ser Ala
355 360 365

Ile Leu Val Phe Val Thr Lys Leu Ser Gly Lys Thr Lys Ile His Val
370 375 380

BCS 04-5003_Erhöhte Akt. OK1 & R1_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

Ala Thr Asp Phe Lys Glu Pro Val Thr Leu His Trp Ala Leu Ser Gln
385 390 395 400

Lys Gly Gly Glu Trp Leu Asp Pro Pro Ser Asp Ile Leu Pro Pro Asn
405 410 415

Ser Leu Pro Val Arg Gly Ala Val Asp Thr Lys Leu Thr Ile Thr Ser
420 425 430

Thr Asp Leu Pro Ser Pro Val Gln Thr Phe Glu Leu Glu Ile Glu Gly
435 440 445

Asp Ser Tyr Lys Gly Met Pro Phe Val Leu Asn Ala Gly Glu Arg Trp
450 455 460

Ile Lys Asn Asn Asp Ser Asp Phe Tyr Val Asp Phe Ala Lys Glu Glu
465 470 475 480

Lys His Val Gln Lys Asp Tyr Gly Asp Gly Lys Gly Thr Ala Lys His
485 490 495

Leu Leu Asp Lys Ile Ala Asp Leu Glu Ser Glu Ala Gln Lys Ser Phe
500 505 510

Met His Arg Phe Asn Ile Ala Ala Asp Leu Val Asp Glu Ala Lys Ser
515 520 525

Ala Gly Gln Leu Gly Phe Ala Gly Ile Leu Val Trp Met Arg Phe Met
530 535 540

Ala Thr Arg Gln Leu Val Trp Asn Lys Asn Tyr Asn Val Lys Pro Arg
545 550 555 560

Glu Ile Ser Lys Ala Gln Asp Arg Leu Thr Asp Leu Leu Gln Asp Val
565 570 575

Tyr Ala Ser Tyr Pro Glu Tyr Arg Glu Leu Leu Arg Met Ile Met Ser
580 585 590

Thr Val Gly Arg Gly Glu Gly Asp Val Gly Gln Arg Ile Arg Asp
595 600 605

Glu Ile Leu Val Ile Gln Arg Lys Asn Asp Cys Lys Gly Gly Ile Met
610 615 620

Glu Glu Trp His Gln Lys Leu His Asn Asn Thr Ser Pro Asp Asp Val
625 630 635 640

Val Ile Cys Gln Ala Leu Met Asp Tyr Ile Lys Ser Asp Phe Asp Leu
645 650 655

BCS 04-5003_Erhöhte Akt. OK1 & R1_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

Ser Val Tyr Trp Lys Thr Leu Asn Asp Asn Gly Ile Thr Lys Glu Arg
660 665 670

Leu Leu Ser Tyr Asp Arg Ala Ile His Ser Glu Pro Asn Phe Arg Gly
675 680 685

Glu Gln Lys Asp Gly Leu Leu Arg Asp Leu Gly His Tyr Met Arg Thr
690 695 700

Leu Lys Ala Val His Ser Gly Ala Asp Leu Glu Ser Ala Ile Gln Asn
705 710 715 720

Cys Met Gly Tyr Gln Asp Asp Gly Glu Gly Phe Met Val Gly Val Gln
725 730 735

Ile Asn Pro Val Ser Gly Leu Pro Ser Gly Tyr Pro Asp Leu Leu Arg
740 745 750

Phe Val Leu Glu His Val Glu Glu Lys Asn Val Glu Pro Leu Leu Glu
755 760 765

Gly Leu Leu Glu Ala Arg Gln Glu Leu Arg Pro Leu Leu Leu Lys Ser
770 775 780

His Asp Arg Leu Lys Asp Leu Leu Phe Leu Asp Leu Ala Leu Asp Ser
785 790 795 800

Thr Val Arg Thr Ala Ile Glu Arg Gly Tyr Glu Gln Leu Asn Asp Ala
805 810 815

Gly Pro Glu Lys Ile Met Tyr Phe Ile Ser Leu Val Leu Glu Asn Leu
820 825 830

Ala Leu Ser Ser Asp Asp Asn Glu Asp Leu Ile Tyr Cys Leu Lys Gly
835 840 845

Trp Gln Phe Ala Leu Asp Met Cys Lys Ser Lys Lys Asp His Trp Ala
850 855 860

Leu Tyr Ala Lys Ser Val Leu Asp Arg Ser Arg Leu Ala Leu Ala Ser
865 870 875 880

Lys Ala Glu Arg Tyr Leu Glu Ile Leu Gln Pro Ser Ala Glu Tyr Leu
885 890 895

Gly Ser Cys Leu Gly Val Asp Gln Ser Ala Val Ser Ile Phe Thr Glu
900 905 910

Glu Ile Ile Arg Ala Gly Ser Ala Ala Ala Leu Ser Ser Leu Val Asn
915 920 925

BCS 04-5003_Erhöhte Akt. OK1 & R1_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

Arg Leu Asp Pro Val Leu Arg Lys Thr Ala Asn Leu Gly Ser Trp Gln
930 935 940

Val Ile Ser Pro Val Glu Val Val Gly Tyr Val Ile Val Val Asp Glu
945 950 955 960

Leu Leu Thr Val Gln Asn Lys Thr Tyr Asp Arg Pro Thr Ile Ile Val
965 970 975

Ala Asn Arg Val Arg Gly Glu Glu Ile Pro Asp Gly Ala Val Ala
980 985 990

Val Leu Thr Pro Asp Met Pro Asp Val Leu Ser His Val Ser Val Arg
995 1000 1005

Ala Arg Asn Gly Lys Ile Cys Phe Ala Thr Cys Phe Asp Ser Gly
1010 1015 1020

Ile Leu Ser Asp Leu Gln Gly Lys Asp Gly Lys Leu Leu Ser Leu
1025 1030 1035

Gln Pro Thr Ser Ala Asp Val Val Tyr Lys Glu Val Asn Asp Ser
1040 1045 1050

Glu Leu Ser Ser Pro Ser Ser Asp Asn Leu Glu Asp Ala Pro Pro
1055 1060 1065

Ser Ile Ser Leu Val Lys Lys Gln Phe Ala Gly Arg Tyr Ala Ile
1070 1075 1080

Ser Ser Glu Glu Phe Thr Ser Asp Leu Val Gly Ala Lys Ser Arg
1085 1090 1095

Asn Ile Gly Tyr Leu Lys Gly Lys Val Pro Ser Trp Val Gly Ile
1100 1105 1110

Pro Thr Ser Val Ala Leu Pro Phe Gly Val Phe Glu Lys Val Ile
1115 1120 1125

Ser Glu Lys Ala Asn Gln Ala Val Asn Asp Lys Leu Leu Val Leu
1130 1135 1140

Lys Lys Thr Leu Asp Glu Gly Asp Gln Gly Ala Leu Lys Glu Ile
1145 1150 1155

Arg Gln Thr Leu Leu Gly Leu Val Ala Pro Pro Glu Leu Val Glu
1160 1165 1170

Glu Leu Lys Ser Thr Met Lys Ser Ser Asp Met Pro Trp Pro Gly
1175 1180 1185

BCS 04-5003_Erhöhte Akt. OK1 & R1_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

Asp Glu Gly Glu Gln Arg Trp Glu Gln Ala Trp Ala Ala Ile Lys
1190 1195 1200

Lys Val Trp Ala Ser Lys Trp Asn Glu Arg Ala Tyr Phe Ser Thr
1205 1210 1215

Arg Lys Val Lys Leu Asp His Asp Tyr Leu Cys Met Ala Val Leu
1220 1225 1230

Val Gln Glu Val Ile Asn Ala Asp Tyr Ala Phe Val Ile His Thr
1235 1240 1245

Thr Asn Pro Ser Ser Gly Asp Ser Ser Glu Ile Tyr Ala Glu Val
1250 1255 1260

Val Lys Gly Leu Gly Glu Thr Leu Val Gly Ala Tyr Pro Gly Arg
1265 1270 1275

Ser Leu Ser Phe Ile Cys Lys Lys Asn Asn Leu Asp Ser Pro Leu
1280 1285 1290

Val Leu Gly Tyr Pro Ser Lys Pro Ile Gly Leu Phe Ile Arg Arg
1295 1300 1305

Ser Ile Ile Phe Arg Ser Asp Ser Asn Gly Glu Asp Leu Glu Gly
1310 1315 1320

Tyr Ala Gly Ala Gly Leu Tyr Asp Ser Val Pro Met Asp Glu Glu
1325 1330 1335

Asp Gln Val Val Leu Asp Tyr Thr Thr Asp Pro Leu Ile Thr Asp
1340 1345 1350

Leu Ser Phe Gln Lys Lys Val Leu Ser Asp Ile Ala Arg Ala Gly
1355 1360 1365

Asp Ala Ile Glu Lys Leu Tyr Gly Thr Ala Gln Asp Ile Glu Gly
1370 1375 1380

Val Ile Arg Asp Gly Lys Leu Tyr Val Val Gln Thr Arg Pro Gln
1385 1390 1395

Val

<210> 10

<211> 4851

<212> DNA

BCS 04-5003_Erhöhte Akt. OK1 & R1_SEQUENZPROTOKOLL.ST25
<213> Solanum tuberosum

<220>

<221> CDS

<222> (105)..(4499)

<223>

<300>

<308> EMBL / Y09533

<309> 1998-07-30

<400>	10															
catcttcatc	gaatttctcg	aagcttcttc	gctaatttcc	tggtttcttc	actcaaaatc	60										
gacgtttcta	gctgaacttg	agtgaattaa	gccagtgaaa	ggat	atg	agt	aat	tcc	116							
					Met	Ser	Asn	Ser								
					1											
tta	ggg	aat	aac	ttg	ctg	tac	cag	gga	ttc	cta	acc	tca	aca	gtg	ttg	
Leu	Gly	Asn	Asn	Leu	Leu	Tyr	Gln	Gly	Phe	Leu	Thr	Ser	Thr	Val	Leu	164
5				10						15					20	
gaa	cat	aaa	agt	aga	atc	agt	cct	cct	tgt	gtt	gga	ggc	aat	tct	ttg	
Glu	His	Lys	Ser	Arg	Ile	Ser	Pro	Pro	Cys	Val	Gly	Gly	Asn	Ser	Leu	212
					25				30						35	
ttt	caa	caa	caa	gtg	atc	tcg	aaa	tca	cct	tta	tca	act	gag	ttt	cga	
Phe	Gln	Gln	Val	Ile	Ser	Lys	Ser	Pro	Leu	Ser	Thr	Glu	Phe	Arg		260
				40				45							50	
ggt	aac	agg	tta	aag	gtg	cag	aaa	aag	aaa	ata	cct	atg	gaa	aag	aag	
Gly	Asn	Arg	Leu	Lys	Val	Gln	Lys	Lys	Lys	Ile	Pro	Met	Glu	Lys	Lys	308
				55			60								65	
cgt	gct	ttt	tct	agt	tct	cct	cat	gct	gtt	ctt	acc	act	gat	acc	tct	
Arg	Ala	Phe	Ser	Ser	Ser	Pro	His	Ala	Val	Leu	Thr	Thr	Asp	Thr	Ser	356
				70			75								80	
tct	gag	cta	gca	gaa	aag	ttc	agt	cta	ggg	ggg	aat	att	gag	cta	cag	
Ser	Glu	Leu	Ala	Glu	Lys	Phe	Ser	Leu	Gly	Gly	Asn	Ile	Glu	Leu	Gln	404
				85			90			95					100	
gtt	gat	gtt	agg	cct	ccc	act	tca	ggt	gat	gtg	tcc	ttt	gtg	gat	ttt	
Val	Asp	Val	Arg	Pro	Pro	Thr	Ser	Gly	Asp	Val	Ser	Phe	Val	Asp	Phe	452
				105				110							115	
caa	gta	aca	aat	ggt	agt	gat	aaa	ctg	ttt	ttg	cac	tgg	ggg	gca	gta	
Gln	Val	Thr	Asn	Gly	Ser	Asp	Lys	Leu	Phe	Leu	His	Trp	Gly	Ala	Val	500
				120			125								130	
aaa	ttc	ggg	aaa	gaa	aca	tgg	tct	ctt	ccg	aat	gat	cgt	cca	gat	ggg	
Lys	Phe	Gly	Lys	Glu	Thr	Trp	Ser	Leu	Pro	Asn	Asp	Arg	Pro	Asp	Gly	548
				135			140					145				
acc	aaa	gtg	tac	aag	aac	aaa	gca	ctt	aga	act	cca	ttt	gtt	aaa	tct	
Thr	Lys	Val	Tyr	Lys	Asn	Lys	Ala	Leu	Arg	Thr	Pro	Phe	Val	Lys	Ser	596
				150			155					160				

BCS 04-5003_Erhöhte Akt. OK1 & R1_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

ggc tct aac tcc atc ctg aga ctg gag ata cga gac act gct atc gaa	644
Gly Ser Asn Ser Ile Leu Arg Leu Glu Ile Arg Asp Thr Ala Ile Glu	
165 170 175 180	
gct att gag ttt ctc ata tac gat gaa gcc cac gat aaa tgg ata aag	692
Ala Ile Glu Phe Leu Ile Tyr Asp Glu Ala His Asp Lys Trp Ile Lys	
185 190 195	
aat aat ggt ggt aat ttt cgt gtc aaa ttg tca aga aaa gag ata cga	740
Asn Asn Gly Gly Ash Phe Arg Val Lys Leu Ser Arg Lys Glu Ile Arg	
200 205 210	
ggc cca gat gtt tct gtt cct gag gag ctt gta cag atc caa tca tat	788
Gly Pro Asp Val Ser Val Pro Glu Glu Leu Val Gln Ile Gln Ser Tyr	
215 220 225	
ttg agg tgg gag agg aag gga aaa cag aat tac ccc cct gag aaa gag	836
Leu Arg Trp Glu Arg Lys Gly Lys Gln Asn Tyr Pro Pro Glu Lys Glu	
230 235 240	
aag gag gaa tat gag gct gct cga act gtg cta cag gag gaa ata gct	884
Lys Glu Glu Tyr Glu Ala Ala Arg Thr Val Leu Gln Glu Glu Ile Ala	
245 250 260	
cgt ggt gct tcc ata cag gac att cga gca agg cta aca aaa act aat	932
Arg Gly Ala Ser Ile Gln Asp Ile Arg Ala Arg Leu Thr Lys Thr Asn	
265 270 275	
gat aaa agt caa agc aaa gaa gag cct ctt cat gta aca aag agt gat	980
Asp Lys Ser Gln Ser Lys Glu Glu Pro Leu His Val Thr Lys Ser Asp	
280 285 290	
ata cct gat gac ctt gcc caa gca caa gct tac att agg tgg gag aaa	1028
Ile Pro Asp Asp Leu Ala Gln Ala Gln Ala Tyr Ile Arg Trp Glu Lys	
295 300 305	
gca gga aag ccg aac tat cct cca gaa aag caa att gaa gaa ctc gaa	1076
Ala Gly Lys Pro Asn Tyr Pro Pro Glu Lys Gln Ile Glu Glu Leu Glu	
310 315 320	
gaa gca aga aga gaa ttg caa ctt gag ctt gag aaa ggc att acc ctt	1124
Glu Ala Arg Arg Glu Leu Gln Leu Glu Leu Glu Lys Gly Ile Thr Leu	
325 330 340	
gat gag ttg cgg aaa acg att aca aaa ggg gag ata aaa act aag gtg	1172
Asp Glu Leu Arg Lys Thr Ile Thr Lys Gly Glu Ile Lys Thr Lys Val	
345 350 355	
gaa aag cac ctg aaa aga agt tct ttt gcc gtt gaa aga atc caa aga	1220
Glu Lys His Leu Lys Arg Ser Ser Phe Ala Val Glu Arg Ile Gln Arg	
360 365 370	
aag aag aga gac ttt ggg cat ctt att aat aag tat act tcc agt cct	1268
Lys Lys Arg Asp Phe Gly His Leu Ile Asn Lys Tyr Thr Ser Ser Pro	
375 380 385	
gca gta caa gta caa aag gtc ttg gaa gaa cca cca gcc tta tct aaa	1316
Ala Val Gln Val Gln Lys Val Leu Glu Glu Pro Pro Ala Leu Ser Lys	
390 395 400	
att aag ctg tat gcc aag gag aag gag gag cag att gat gat ccg atc	1364
Ile Lys Leu Tyr Ala Lys Glu Lys Glu Glu Gln Ile Asp Asp Pro Ile	
405 410 415 420	
cta aat aaa aag atc ttt aag gtc gat gat ggg gag cta ctg gta ctg	1412
Leu Asn Lys Lys Ile Phe Lys Val Asp Asp Gly Glu Leu Leu Val Leu	
425 430 435	

BCS 04-5003_Erhöhte Akt. OK1 & R1_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

gta gca aag tcc tct ggg aag aca aaa gta cat cta gct aca gat ctg Val Ala Lys Ser Ser Gly Lys Thr Lys Val His Leu Ala Thr Asp Leu 440 445 450	1460
aat cag cca att act ctt cac tgg gca tta tcc aaa agt cct gga gag Asn Gln Pro Ile Thr Leu His Trp Ala Leu Ser Lys Ser Pro Gly Glu 455 460 465	1508
tgg atg gta cca cct tca agc ata ttg cct cct ggg tca att att tta Trp Met Val Pro Pro Ser Ser Ile Leu Pro Pro Gly Ser Ile Ile Leu 470 475 480	1556
gac aag gct gcc gaa aca cct ttt tca gcc agt tct tct gat ggt cta Asp Lys Ala Ala Glu Thr Pro Phe Ser Ala Ser Ser Asp Gly Leu 485 490 495 500	1604
act tct aag gta caa tct ttg gat ata gta att gaa gat ggc aat ttt Thr Ser Lys Val Gln Ser Leu Asp Ile Val Ile Glu Asp Gly Asn Phe 505 510 515	1652
gtg ggg atg cca ttt gtt ctt ttg tct ggt gaa aaa tgg att aag aac Val Gly Met Pro Phe Val Leu Leu Ser Gly Glu Lys Trp Ile Lys Asn 520 525 530	1700
caa ggg tcg gat ttc tat gtt ggc ttc agt gct gca tcc aaa tta gca Gln Gly Ser Asp Phe Tyr Val Gly Phe Ser Ala Ala Ser Lys Leu Ala 535 540 545	1748
ctc aag gct gct ggg gat ggc agt gga act gca aag tct tta ctg gat Leu Lys Ala Ala Gly Asp Gly Ser Gly Thr Ala Lys Ser Leu Leu Asp 550 555 560	1796
aaa ata gca gat atg gaa agt gag gct cag aag tca ttt atg cac cgg Lys Ile Ala Asp Met Glu Ser Glu Ala Gln Lys Ser Phe Met His Arg 565 570 575 580	1844
ttt aat att gca gct gac ttg ata gaa gat gcc act agt gct ggt gaa Phe Asn Ile Ala Ala Asp Leu Ile Glu Asp Ala Thr Ser Ala Gly Glu 585 590 595	1892
ctt ggt ttt gct gga att ctt gta tgg atg agg ttc atg gct aca agg Leu Gly Phe Ala Gly Ile Leu Val Trp Met Arg Phe Met Ala Thr Arg 600 605 610	1940
caa ctg ata tgg aac aaa aac tat aac gta aaa cca cgt gaa ata agc Gln Leu Ile Trp Asn Lys Ash Tyr Asn Val Lys Pro Arg Glu Ile Ser 615 620 625	1988
aag gct cag gac aga ctt aca gac ttg ttg cag aat gct ttc acc agt Lys Ala Gln Asp Arg Leu Thr Asp Leu Leu Gln Asn Ala Phe Thr Ser 630 635 640	2036
cac cct cag tac cgt gaa att ttg cgg atg att atg tca act gtt gga His Pro Gln Tyr Arg Glu Ile Leu Arg Met Ile Met Ser Thr Val Gly 645 650 655 660	2084
cgt gga ggt gaa ggg gat gta gga cag cga att agg gat gaa att ttg Arg Gly Gly Glu Gly Asp Val Gly Gln Arg Ile Arg Asp Glu Ile Leu 665 670 675	2132
gtc atc cag agg aac aat gac tgc aag ggt ggt atg atg caa gaa tgg Val Ile Gln Arg Asn Asn Asp Cys Lys Gly Gly Met Met Gln Glu Trp 680 685 690	2180
cat cag aaa ttg cat aat aat act agt cct gat gat gtt gtg atc tgt His Gln Lys Leu His Asn Asn Thr Ser Pro Asp Asp Val Val Ile Cys 695 700 705	2228

BCS 04-5003_Erhöhte Akt. OK1 & R1_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

cag gca tta att gac tac atc aag agt gat ttt gat ctt ggt gtt tat Gln Ala Leu Ile Asp Tyr Ile Lys Ser Asp Phe Asp Leu Gly Val Tyr 710 715 720	2276
tgg aaa acc ctg aat gag aac gga ata aca aaa gag cgt ctt ttg agt Trp Lys Thr Leu Asn Glu Asn Gly Ile Thr Lys Glu Arg Leu Leu Ser 725 730 735 740	2324
aat gac cgt gct atc cat tct gaa cca aat ttt aga gga gat caa aag Tyr Asp Arg Ala Ile His Ser Glu Pro Asn Phe Arg Gly Asp Gln Lys 745 750 755	2372
ggt ggt ctt ttg cgt gat tta ggt cac tat atg aga aca ttg aag gca Gly Gly Leu Leu Arg Asp Leu Gly His Tyr Met Arg Thr Leu Lys Ala 760 765 770	2420
gtt cat tca ggt gca gat ctt gag tct gct att gca aac tgc atg ggc Val His Ser Gly Ala Asp Leu Glu Ser Ala Ile Ala Asn Cys Met Gly 775 780 785	2468
tac aaa act gag gga gaa ggc ttt atg gtt gga gtc cag ata aat cct Tyr Lys Thr Glu Gly Glu Phe Met Val Gly Val Gln Ile Asn Pro 790 795 800	2516
gta tca ggc ttg cca tct ggc ttt cag gac ctc ctc cat ttt gtc tta Val Ser Gly Leu Pro Ser Gly Phe Gln Asp Leu Leu His Phe Val Leu 805 810 815 820	2564
gac cat gtg gaa gat aaa aat gtg gaa act ctt ctt gag aga ttg cta Asp His Val Glu Asp Lys Asn Val Glu Thr Leu Leu Glu Arg Leu Leu 825 830 835	2612
gag gct cgt gag gag ctt agg ccc ttg ctt ctc aaa cca aac aac cgt Glu Ala Arg Glu Glu Leu Arg Pro Leu Leu Leu Lys Pro Asn Asn Arg 840 845 850	2660
cta aag gat ctg ctg ttt ttg gac ata gca ctt gat tct aca gtt aga Leu Lys Asp Leu Leu Phe Leu Asp Ile Ala Leu Asp Ser Thr Val Arg 855 860 865	2708
aca gca gta gaa agg gga tat gaa gaa ttg aac aac gct aat cct gag Thr Ala Val Glu Arg Gly Tyr Glu Glu Leu Asn Asn Ala Asn Pro Glu 870 875 880	2756
aaa atc atg tac ttc atc tcc ctc gtt ctt gaa aat ctc gca ctc tct Lys Ile Met Tyr Phe Ile Ser Leu Val Leu Glu Asn Leu Ala Leu Ser 885 890 895 900	2804
gtg gac gat aat gaa gat ctt gtt tat tgc ttg aag gga ttg aat caa Val Asp Asp Asn Glu Asp Leu Val Tyr Cys Leu Lys Gly Trp Asn Gln 905 910 915	2852
gct ctt tca atg tcc aat ggt ggg gac aac cat tgg gct tta ttt gca Ala Leu Ser Met Ser Asn Gly Gly Asp Asn His Trp Ala Leu Phe Ala 920 925 930	2900
aaa gct gtg ctt gac aga acc cgt ctt gca ctt gca agc aag gca gag Lys Ala Val Leu Asp Arg Thr Arg Leu Ala Leu Ala Ser Lys Ala Glu 935 940 945	2948
tgg tac cat cac tta ttg cag cca tct gcc gaa tat cta gga tca ata Trp Tyr His His Leu Leu Gln Pro Ser Ala Glu Tyr Leu Gly Ser Ile 950 955 960	2996
ctt ggg gtg gac caa tgg gct ttg aac ata ttt act gaa gaa att ata Leu Gly Val Asp Gln Trp Ala Leu Asn Ile Phe Thr Glu Glu Ile Ile 965 970 975 980	3044

BCS 04-5003_Erhöhte Akt. OK1 & R1_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

cgt gct gga tca gca gct tca tta tcc tct ctt ctt aat aga ctc gat	3092
Arg Ala Gly Ser Ala Ala Ser Leu Ser Ser Leu Leu Asn Arg Leu Asp	
985 990 995	
ccc gtg ctt cgaa aaa act gca aat cta gga agt tgg cag att atc	3137
Pro Val Leu Arg Lys Thr Ala Asn Leu Gly Ser Trp Gln Ile Ile	
1000 1005 1010	
agt cca gtt gaa gcc gtt gga tat gtt gtc gtt gtg gat gag ttg	3182
Ser Pro Val Glu Ala Val Gly Tyr Val Val Val Val Asp Glu Leu	
1015 1020 1025	
ctt tca gtt cag aat gaa atc tac gag aag ccc acg atc tta gta	3227
Leu Ser Val Gln Asn Glu Ile Tyr Glu Lys Pro Thr Ile Leu Val	
1030 1035 1040	
gca aaa tct gtt aaa gga gag gag gaa att cct gat ggt gct gtt	3272
Ala Lys Ser Val Lys Gly Glu Glu Glu Ile Pro Asp Gly Ala Val	
1045 1050 1055	
gcc ctg ata aca cca gac atg cca gat gtt ctt tca cat gtt tct	3317
Ala Leu Ile Thr Pro Asp Met Pro Asp Val Leu Ser His Val Ser	
1060 1065 1070	
gtt cga gct aga aat ggg aag gtt tgc ttt gct aca tgc ttt gat	3362
Val Arg Ala Arg Asn Gly Lys Val Cys Phe Ala Thr Cys Phe Asp	
1075	
ccc aat ata ttg gct gac ctc caa gca aag gaa gga agg att ttg	3407
Pro Asn Ile Leu Ala Asp Leu Gln Ala 1095	
1090	
ctc tta aag cct aca cct tca gac ata atc tat agt gag gtg aat	3452
Leu Leu Lys Pro Thr Pro Ser Asp Ile Ile Tyr Ser Glu Val Asn	
1105 1110 1115	
gag att gag ctc caa agt tca agt aac ttg gta gaa gct gaa act	3497
Glü Ile Glu Leu Gln Ser Ser Ser Asn 1125	
1120	
tca gca aca ctt aga ttg gtg aaa aag caa ttt ggt ggt tgt tac	3542
Ser Ala Thr Leu Arg Leu Val Lys 1140	
1135	
gca ata tca gca gat gaa ttc aca agt gaa atg gtt gga gct aaa	3587
Ala Ile Ser Ala Asp Glu Phe Thr Ser Glu Met Val Gly Ala Lys	
1150	
tca cgt aat att gca tat ctg aaa gga aaa gtg cct tcc tcg gtg	3632
Ser Arg Asn Ile Ala Tyr Leu Lys 1170	
1165	
gga att cct acg tca gta gct ctt cca ttt gga gtc ttt gag aaa	3677
Gly Ile Pro Thr Ser Val Ala Leu Pro Phe Gly Val Phe Glu Lys	
1180 1185 1190	
gta ctt tca gac gac ata aat cag gga gtg gca aaa gag ttg caa	3722
Val Leu Ser Asp Asp Ile Asn Gln Gly Val Ala Lys Glu Leu Gln	
1195	
att ctg atg aaa aaa cta tct gaa gga gac ttc agc gct ctt ggt	3767
Ile Leu Met Lys Lys Leu Ser Glu Gly Asp Phe Ser Ala Leu Gly	
1210 1215 1220	
gaa att cgc aca acg gtt tta gat ctt tca gca cca gct caa ttg	3812
Glu Ile Arg Thr Thr Val Leu Asp Leu Ser Ala Pro Ala Gln Leu	
1225 1230 1235	

BCS 04-5003_Erhöhte Akt. OK1 & R1_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

gtc aaa gag ctg aag gag aag atg cag ggt tct ggc atg cct tgg	3857
Val Lys Glu Leu Lys Glu Lys Met Gln Gly Ser Gly Met Pro Trp	
1240 1245 1250	
cct ggt gat gaa ggt cca aag cgg tgg gaa caa gca tgg atg gcc	3902
Pro Gly Asp Glu Gly Pro Lys Arg Trp Glu Gln Ala Trp Met Ala	
1255 1260 1265	
ata aaa aag gtg tgg gct tca aaa tgg aat gag aga gca tac ttc	3947
Ile Lys Lys Val Trp Ala Ser Lys Trp Asn Glu Arg Ala Tyr Phe	
1270 1275 1280	
agc aca agg aag gtg aaa ctg gat cat gac tat ctg tgc atg gct	3992
Ser Thr Arg Lys Val Lys Leu Asp His Asp Tyr Leu Cys Met Ala	
1285 1290 1295	
gtc ctt gtt caa gaa ata ata aat gct gat tat gca ttt gtc att	4037
Val Leu Val Gln Glu Ile Ile Asn Ala Asp Tyr Ala Phe Val Ile	
1300 1305 1310	
cac aca acc aac cca tct tcc gga gac gac tca gaa ata tat gcc	4082
His Thr Thr Asn Pro Ser Ser Gly Asp Asp Ser Glu Ile Tyr Ala	
1315 1320 1325	
gag gtg gtc agg ggc ctt ggg gaa aca ctt gtt gga gct tat cca	4127
Glu Val Val Arg Gly Leu Gly Glu Thr Leu Val Gly Ala Tyr Pro	
1330 1335 1340	
gga cgt gct ttg agt ttt atc tgc aag aaa aag gat ctc aac tct	4172
Gly Arg Ala Leu Ser Phe Ile Cys Lys Lys Lys Asp Leu Asn Ser	
1345 1350 1355	
cct caa gtg tta ggt tac cca agc aaa ccg atc ggc ctt ttc ata	4217
Pro Gln Val Leu Gly Tyr Pro Ser Lys Pro Ile Gly Leu Phe Ile	
1360 1365 1370	
aaa aga tct atc atc ttc cga tct gat tcc aat ggg gaa gat ttg	4262
Lys Arg Ser Ile Ile Phe Arg Ser Asp Ser Asn Gly Glu Asp Leu	
1375 1380 1385	
gaa ggt tat gcc ggt gct ggc ctc tac gac agt gta cca atg gat	4307
Glu Gly Tyr Ala Gly Ala Gly Leu Tyr Asp Ser Val Pro Met Asp	
1390 1395 1400	
gag gag gaa aaa gtt gta att gat tac tct tcc gac cca ttg ata	4352
Glu Glu Glu Lys Val Val Ile Asp Tyr Ser Ser Asp Pro Leu Ile	
1405 1410 1415	
act gat ggt aac ttc cgc cag aca atc ctg tcc aac att gct cgt	4397
Thr Asp Gly Asn Phe Arg Gln Thr Ile Leu Ser Asn Ile Ala Arg	
1420 1425 1430	
gct gga cat gct atc gag gag cta tat ggc tct cct caa gac att	4442
Ala Gly His Ala Ile Glu Glu Leu Tyr Gly Ser Pro Gln Asp Ile	
1435 1440 1445	
gag ggt gta gtg agg gat gga aag att tat gtc gtt cag aca aga	4487
Glu Gly Val Val Arg Asp Gly Lys Ile Tyr Val Val Gln Thr Arg	
1450 1455 1460	
cca cag atg tga ttatattctc gttgtatgtt gttcagagaa gaccacagat	4539
Pro Gln Met	
gtgatcatat tctcattgtta tcagatctgt gaccacttac ctgatacctc ccatgaagtt	4599
acctgtatga ttatacgtga tccaaagcca tcacatcatg ttcacaccca gctattggag	4659

BCS 04-5003_Erhöhte Akt. OK1 & R1_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

gagaagttaga aagtaggaat tgcaatatga ggaataataa gaaaaacttt gtaaaagcta 4719
aatttagctgg gtatgatata gggagaaatg tgtaaacatt gtactatata tagtatatac 4779
acacgcatta tgtattgcat tatgcactga ataatatcgc agcatcaaag aagaaatcct 4839
ttgggtggtt tc 4851

<210> 11

<211> 1464

<212> PRT

<213> Solanum tuberosum

<400> 11

Met Ser Asn Ser Leu Gly Asn Asn Leu Leu Tyr Gln Gly Phe Leu Thr
1 5 10 15

Ser Thr Val Leu Glu His Lys Ser Arg Ile Ser Pro Pro Cys Val Gly
20 25 30

Gly Asn Ser Leu Phe Gln Gln Val Ile Ser Lys Ser Pro Leu Ser
35 40 45

Thr Glu Phe Arg Gly Asn Arg Leu Lys Val Gln Lys Lys Ile Pro
50 55 60

Met Glu Lys Lys Arg Ala Phe Ser Ser Ser Pro His Ala Val Leu Thr
65 70 75 80

Thr Asp Thr Ser Ser Glu Leu Ala Glu Lys Phe Ser Leu Gly Gly Asn
85 90 95

Ile Glu Leu Gln Val Asp Val Arg Pro Pro Thr Ser Gly Asp Val Ser
100 105 110

Phe Val Asp Phe Gln Val Thr Asn Gly Ser Asp Lys Leu Phe Leu His
115 120 125

Trp Gly Ala Val Lys Phe Gly Lys Glu Thr Trp Ser Leu Pro Asn Asp
130 135 140

Arg Pro Asp Gly Thr Lys Val Tyr Lys Asn Lys Ala Leu Arg Thr Pro
145 150 155 160

Phe Val Lys Ser Gly Ser Asn Ser Ile Leu Arg Leu Glu Ile Arg Asp
165 170 175

Thr Ala Ile Glu Ala Ile Glu Phe Leu Ile Tyr Asp Glu Ala His Asp
180 185 190

BCS 04-5003_Erhöhte Akt. OK1 & R1_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

Lys Trp Ile Lys Asn Asn Gly Gly Asn Phe Arg Val Lys Leu Ser Arg
195 200 205

Lys Glu Ile Arg Gly Pro Asp Val Ser Val Pro Glu Glu Leu Val Gln
210 215 220

Ile Gln Ser Tyr Leu Arg Trp Glu Arg Lys Gly Lys Gln Asn Tyr Pro
225 230 235 240

Pro Glu Lys Glu Lys Glu Glu Tyr Glu Ala Ala Arg Thr Val Leu Gln
245 250 255

Glu Glu Ile Ala Arg Gly Ala Ser Ile Gln Asp Ile Arg Ala Arg Leu
260 265 270

Thr Lys Thr Asn Asp Lys Ser Gln Ser Lys Glu Glu Pro Leu His Val
275 280 285

Thr Lys Ser Asp Ile Pro Asp Asp Leu Ala Gln Ala Gln Ala Tyr Ile
290 295 300

Arg Trp Glu Lys Ala Gly Lys Pro Asn Tyr Pro Pro Glu Lys Gln Ile
305 310 315 320

Glu Glu Leu Glu Glu Ala Arg Arg Glu Leu Gln Leu Glu Leu Glu Lys
325 330 335

Gly Ile Thr Leu Asp Glu Leu Arg Lys Thr Ile Thr Lys Gly Glu Ile
340 345 350

Lys Thr Lys Val Glu Lys His Leu Lys Arg Ser Ser Phe Ala Val Glu
355 360 365

Arg Ile Gln Arg Lys Lys Arg Asp Phe Gly His Leu Ile Asn Lys Tyr
370 375 380

Thr Ser Ser Pro Ala Val Gln Val Gln Lys Val Leu Glu Glu Pro Pro
385 390 395 400

Ala Leu Ser Lys Ile Lys Leu Tyr Ala Lys Glu Lys Glu Glu Gln Ile
405 410 415

Asp Asp Pro Ile Leu Asn Lys Lys Ile Phe Lys Val Asp Asp Gly Glu
420 425 430

Leu Leu Val Leu Val Ala Lys Ser Ser Gly Lys Thr Lys Val His Leu
435 440 445

Ala Thr Asp Leu Asn Gln Pro Ile Thr Leu His Trp Ala Leu Ser Lys
450 455 460

BCS 04-5003_Erhöhte Akt. OK1 & R1_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

Ser Pro Gly Glu Trp Met Val Pro Pro Ser Ser Ile Leu Pro Pro Gly
465 470 475 480

Ser Ile Ile Leu Asp Lys Ala Ala Glu Thr Pro Phe Ser Ala Ser Ser
485 490 495

Ser Asp Gly Leu Thr Ser Lys Val Gln Ser Leu Asp Ile Val Ile Glu
500 505 510

Asp Gly Asn Phe Val Gly Met Pro Phe Val Leu Leu Ser Gly Glu Lys
515 520 525

Trp Ile Lys Asn Gln Gly Ser Asp Phe Tyr Val Gly Phe Ser Ala Ala
530 535 540

Ser Lys Leu Ala Leu Lys Ala Ala Gly Asp Gly Ser Gly Thr Ala Lys
545 550 555 560

Ser Leu Leu Asp Lys Ile Ala Asp Met Glu Ser Glu Ala Gln Lys Ser
565 570 575

Phe Met His Arg Phe Asn Ile Ala Ala Asp Leu Ile Glu Asp Ala Thr
580 585 590

Ser Ala Gly Glu Leu Gly Phe Ala Gly Ile Leu Val Trp Met Arg Phe
595 600 605

Met Ala Thr Arg Gln Leu Ile Trp Asn Lys Asn Tyr Asn Val Lys Pro
610 615 620

Arg Glu Ile Ser Lys Ala Gln Asp Arg Leu Thr Asp Leu Leu Gln Asn
625 630 635 640

Ala Phe Thr Ser His Pro Gln Tyr Arg Glu Ile Leu Arg Met Ile Met
645 650 655

Ser Thr Val Gly Arg Gly Glu Gly Asp Val Gly Gln Arg Ile Arg
660 665 670

Asp Glu Ile Leu Val Ile Gln Arg Asn Asn Asp Cys Lys Gly Gly Met
675 680 685

Met Gln Glu Trp His Gln Lys Leu His Asn Asn Thr Ser Pro Asp Asp
690 695 700

Val Val Ile Cys Gln Ala Leu Ile Asp Tyr Ile Lys Ser Asp Phe Asp
705 710 715 720

Leu Gly Val Tyr Trp Lys Thr Leu Asn Glu Asn Gly Ile Thr Lys Glu
725 730 735

BCS 04-5003_Erhöhte Akt. OKI & R1_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

Arg Leu Leu Ser Tyr Asp Arg Ala Ile His Ser Glu Pro Asn Phe Arg
740 745 750

Gly Asp Gln Lys Gly Gly Leu Leu Arg Asp Leu Gly His Tyr Met Arg
755 760 765

Thr Leu Lys Ala Val His Ser Gly Ala Asp Leu Glu Ser Ala Ile Ala
770 775 780

Asn Cys Met Gly Tyr Lys Thr Glu Gly Glu Gly Phe Met Val Gly Val
785 790 795 800

Gln Ile Asn Pro Val Ser Gly Leu Pro Ser Gly Phe Gln Asp Leu Leu
805 810 815

His Phe Val Leu Asp His Val Glu Asp Lys Asn Val Glu Thr Leu Leu
820 825 830

Glu Arg Leu Leu Glu Ala Arg Glu Glu Leu Arg Pro Leu Leu Lys
835 840 845

Pro Asn Asn Arg Leu Lys Asp Leu Leu Phe Leu Asp Ile Ala Leu Asp
850 855 860

Ser Thr Val Arg Thr Ala Val Glu Arg Gly Tyr Glu Glu Leu Asn Asn
865 870 875 880

Ala Asn Pro Glu Lys Ile Met Tyr Phe Ile Ser Leu Val Leu Glu Asn
885 890 895

Leu Ala Leu Ser Val Asp Asp Asn Glu Asp Leu Val Tyr Cys Leu Lys
900 905 910

Gly Trp Asn Gln Ala Leu Ser Met Ser Asn Gly Gly Asp Asn His Trp
915 920 925

Ala Leu Phe Ala Lys Ala Val Leu Asp Arg Thr Arg Leu Ala Leu Ala
930 935 940

Ser Lys Ala Glu Trp Tyr His His Leu Leu Gln Pro Ser Ala Glu Tyr
945 950 955 960

Leu Gly Ser Ile Leu Gly Val Asp Gln Trp Ala Leu Asn Ile Phe Thr
965 970 975

Glu Glu Ile Ile Arg Ala Gly Ser Ala Ala Ser Leu Ser Ser Leu Leu
980 985 990

Asn Arg Leu Asp Pro Val Leu Arg Lys Thr Ala Asn Leu Gly Ser Trp
995 1000 1005

BCS 04-5003_Erhöhte Akt. OK1 & R1_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

Gln Ile Ile Ser Pro Val Glu Ala Val Gly Tyr Val Val Val Val
1010 1015 1020

Asp Glu Leu Leu Ser Val Gln Asn Glu Ile Tyr Glu Lys Pro Thr
1025 1030 1035

Ile Leu Val Ala Lys Ser Val Lys Gly Glu Glu Glu Ile Pro Asp
1040 1045 1050

Gly Ala Val Ala Leu Ile Thr Pro Asp Met Pro Asp Val Leu Ser
1055 1060 1065

His Val Ser Val Arg Ala Arg Asn Gly Lys Val Cys Phe Ala Thr
1070 1075 1080

Cys Phe Asp Pro Asn Ile Leu Ala Asp Leu Gln Ala Lys Glu Gly
1085 1090 1095

Arg Ile Leu Leu Leu Lys Pro Thr Pro Ser Asp Ile Ile Tyr Ser
1100 1105 1110

Glu Val Asn Glu Ile Glu Leu Gln Ser Ser Ser Asn Leu Val Glu
1115 1120 1125

Ala Glu Thr Ser Ala Thr Leu Arg Leu Val Lys Lys Gln Phe Gly
1130 1135 1140

Gly Cys Tyr Ala Ile Ser Ala Asp Glu Phe Thr Ser Glu Met Val
1145 1150 1155

Gly Ala Lys Ser Arg Asn Ile Ala Tyr Leu Lys Gly Lys Val Pro
1160 1165 1170

Ser Ser Val Gly Ile Pro Thr Ser Val Ala Leu Pro Phe Gly Val
1175 1180 1185

Phe Glu Lys Val Leu Ser Asp Asp Ile Asn Gln Gly Val Ala Lys
1190 1195 1200

Glu Leu Gln Ile Leu Met Lys Lys Leu Ser Glu Gly Asp Phe Ser
1205 1210 1215

Ala Leu Gly Glu Ile Arg Thr Thr Val Leu Asp Leu Ser Ala Pro
1220 1225 1230

Ala Gln Leu Val Lys Glu Leu Lys Glu Lys Met Gln Gly Ser Gly
1235 1240 1245

Met Pro Trp Pro Gly Asp Glu Gly Pro Lys Arg Trp Glu Gln Ala
1250 1255 1260

BCS 04-5003_Erhöhte Akt. OK1 & R1_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

Trp Met Ala Ile Lys Lys Val 1265 Trp Ala Ser Lys Trp 1270 Asn Glu Arg 1275
Ala Tyr Phe Ser Thr Arg Lys Val 1280 Lys Leu Asp His 1285 Asp Tyr Leu 1290
Cys Met Ala Val Leu Val Gln 1295 Glu Ile Ile Asn Ala 1300 Asp Tyr Ala 1305
Phe Val Ile His Thr Thr Asn 1310 Pro Ser Ser Gly Asp 1315 Asp Ser Glu 1320
Ile Tyr Ala Glu Val Val Arg 1325 1330 Gly Leu Gly Glu Thr 1335 Leu Val Gly
Ala Tyr Pro Gly Arg Ala Leu 1340 Ser Phe Ile Cys Lys 1345 Lys Lys Asp 1350
Leu Asn Ser Pro Gln Val Leu 1355 Gly Tyr Pro Ser Lys 1360 1365 Pro Ile Gly
Leu Phe Ile Lys Arg Ser Ile 1370 1375 Ile Phe Arg Ser Asp 1380 Ser Asn Gly
Glu Asp Leu Glu Gly Tyr Ala 1385 1390 Gly Ala Gly Leu Tyr 1395 Asp Ser Val
Pro Met Asp Glu Glu Glu Lys 1400 Val Val Ile Asp Tyr 1405 Ser Ser Asp 1410
Pro Leu Ile Thr Asp Gly Asn 1415 Phe Arg Gln Thr Ile 1420 1425 Leu Ser Asn
Ile Ala Arg Ala Gly His Ala 1430 1435 Ile Glu Glu Leu Tyr 1440 Gly Ser Pro
Gln Asp Ile Glu Gly Val Val 1445 1450 Arg Asp Gly Lys Ile 1455 Tyr Val Val
Gln Thr Arg Pro Gln Met 1460

<210> 12

<211> 4576

<212> DNA

<213> Oryza sativa

BCS 04-5003_Erhöhte Akt. OK1 & R1_SEQUENZPROTOKOLL_ST25

<220>

<221> CDS

<222> (20)..(4393)

<223>

<300>

<308> NCBI / AR400814

<309> 2003-12-18

<400> 12
 cttacagata ttcgtgcag atg agc gga ttc tcc gcg gca gct gct gcg gcc
 Met Ser Gly Phe Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala 52
 1 5 10
 gag cggtgcgctcggcctcggtcgtcacgcccggccgtcgccccc
 Glu Arg Cys Ala Leu Gly Leu Gly Val His Ala Arg Pro Ala Ser Pro 100
 15 20 25
 tcg ccg gcg ctgcgtcccgccggcgtctccgcgcggccgtcgtctc
 Ser Pro Ala Leu Leu Pro Pro Ala Ala Leu Arg Arg Gly Arg Arg Leu 148
 30 35 40
 ccc gcg gcc acc acc acc ctc gcc gtc tcc cgt cggtcgccctcgtcc
 Pro Ala Ala Thr Thr Thr Leu Ala Val Ser Arg Arg Ser Leu Leu Ala 196
 45 50 55
 cct cgc gcc atc gcc gct tcc acc ggc cgc gcc tcc cct ggccgtt gtc
 Pro Arg Ala Ile Ala Ala Ser Thr Gly Arg Ala Ser Pro Gly Leu Val 244
 60 65 70 75
 gga agg ttc acc ctg gat gcc aac tcc gag ctt aag gtg aca ttg aac
 Gly Arg Phe Thr Leu Asp Ala Asn Ser Glu Leu Lys Val Thr Leu Asn 292
 80 85 90
 cca gca ccg cag ggt tcg gtg gtg gag atc aat cta gag gca act aac
 Pro Ala Pro Gln Gly Ser Val Val Glu Ile Asn Leu Glu Ala Thr Asn 340
 95 100 105
 acc agc ggc tcc ctg ata ctg cat tgg ggc gcc ctt cgc ccg gat aga
 Thr Ser Gly Ser Leu Ile Leu His Trp Gly Ala Leu Arg Pro Asp Arg 388
 110 115 120
 gga gaa tgg ctc cta cca tcc cgg aaa cca gat ggc acg aca gtg tac
 Gly Glu Trp Leu Leu Pro Ser Arg Lys Pro Asp Gly Thr Thr Val Tyr 436
 125 130 135
 aag aac agg gct ctt agg acg cct ttt ata aag tca ggt gat aac tcc
 Lys Asn Arg Ala Leu Arg Thr Pro Phe Ile Lys Ser Gly Asp Asn Ser 484
 140 145 150 155
 acg ctg aaa att gag ata gat gat cct gca gtg caa gcc att gag ttc
 Thr Leu Lys Ile Glu Ile Asp Asp Pro Ala Val Gln Ala Ile Glu Phe 532
 160 165 170
 ctc ata ttt gat gag gca cgg aat aat tgg tac aaa aac aat ggc cag
 Leu Ile Phe Asp Glu Ala Arg Asn Asn Trp Tyr Lys Asn Asn Gly Gln 580
 175 180 185
 aat ttc caa att cag cta caa gcg agc caa tat caa ggg cag ggt aca
 Seite 56 628

BCS 04-5003_Erhöhte Akt. OK1 & R1_SEQUENZPROTOKOLL.ST25
 Asn Phe Gln Ile Gln Leu Gln Ala Ser Gln Tyr Gln Gly Gln Gly Thr
 190 195 200

tct act gct act tct act gtg gtt cca gag gat ctt gtg cag ata	676
Ser Thr Ala Thr Ser Ser Thr Val Val Pro Glu Asp Leu Val Gln Ile	
205 210 215	
caa tca tat ctt cgg tgg gaa aga aag gga aag cag tca tat aca cct	724
Gln Ser Tyr Leu Arg Trp Glu Arg Lys Gly Lys Gln Ser Tyr Thr Pro	
220 225 230 235	
gag caa gag aag gag gag tat gaa gca gca cga act gag ttg ata gag	772
Glu Gln Glu Lys Glu Glu Tyr Glu Ala Ala Arg Thr Glu Leu Ile Glu	
240 245 250	
gaa tta aac aag ggt gtt tct ttg gag aag cta cga gcg aaa ctg aca	820
Glu Leu Asn Lys Gly Val Ser Leu Glu Lys Leu Arg Ala Lys Leu Thr	
255 260 265	
aag aca cct gag gca act gat agt aat gct cct gca tct gaa agc act	868
Lys Thr Pro Glu Ala Thr Asp Ser Asn Ala Pro Ala Ser Glu Ser Thr	
270 275 280	
gtg act act aaa gtc cca gag gaa ctt gta caa gtc cag gct tac ata	916
Val Thr Thr Lys Val Pro Glu Glu Leu Val Gln Val Gln Ala Tyr Ile	
285 290 295	
agg tgg gag aaa gca ggc aag cca aat tat gcc cca gag aag caa ttg	964
Arg Trp Glu Lys Ala Gly Lys Pro Asn Tyr Ala Pro Glu Lys Gln Leu	
300 305 310 315	
gtc gag ttt gag gaa gca agg aag gaa ctg cag tct gag ttg gat aag	1012
Val Glu Phe Glu Glu Ala Arg Lys Glu Leu Gln Ser Glu Leu Asp Lys	
320 325 330	
ggg acc tca gtt gag cag ttg agg aac aaa att ttg aaa ggg aac att	1060
Gly Thr Ser Val Glu Gln Leu Arg Asn Lys Ile Leu Lys Gly Asn Ile	
335 340 345	
gag aca aaa gtt tcc aag cag ctg aag gac aaa aaa tac ttt tct gtg	1108
Glu Thr Lys Val Ser Lys Gln Leu Lys Asp Lys Lys Tyr Phe Ser Val	
350 355 360	
gaa aga att cag cgg aaa aaa cga gat att gtg caa cta ctt aaa aaa	1156
Glu Arg Ile Gln Arg Lys Lys Arg Asp Ile Val Gln Leu Leu Lys Lys	
365 370 375	
cac aag cct act gtt atg gaa gcg caa gta gag act cct aaa caa ccc	1204
His Lys Pro Thr Val Met Glu Ala Gln Val Glu Thr Pro Lys Gln Pro	
380 385 390 395	
act gtt ctg gat ctc ttc aca aag tca tta cag gag cag gat aac tgt	1252
Thr Val Leu Asp Leu Phe Thr Lys Ser Leu Gln Glu Gln Asp Asn Cys	
400 405 410	
gag gtt cta agc aga aag ctt ttc aag ttc ggt gac aag gag ata ctg	1300
Glu Val Leu Ser Arg Lys Leu Phe Lys Phe Gly Asp Lys Glu Ile Leu	
415 420 425	
gga att acc acc gtt gct cta gga aaa acc aaa gtt cac ttg gca aca	1348
Gly Ile Thr Thr Val Ala Leu Gly Lys Thr Lys Val His Leu Ala Thr	
430 435 440	
aac tat atg gag cca ctt ata ctt cac tgg gcg ttg tca aaa gag aat	1396
Asn Tyr Met Glu Pro Leu Ile Leu His Trp Ala Leu Ser Lys Glu Asn	
445 450 455	
gga gag tgg cag gca cct ccc tca agc ata ttg cca tct ggt tca tca	1444

BCS 04-5003_Erhöhte Akt. OK1 & R1_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

Gly	Glu	Trp	Gln	Ala	Pro	Pro	Ser	Ser	Ile	Leu	Pro	Ser	Gly	Ser	Ser	460	465	470	475	
ttg	cta	gac	aag	gca	tgt	gaa	act	tca	tcc	agt	gaa	tat	gaa	ttg	aat	1492				
Leu	Leu	Asp	Lys	Ala	Cys	Glu	Thr	Ser	Phe	Ser	Glu	Tyr	Glu	Leu	Asn					
480									485					490						
ggt	ctg	cat	tgt	cag	gtt	gtt	gag	atc	gag	ctt	gac	gat	ggt	gga	tac	1540				
Gly	Leu	His	Cys	Gln	Val	Val	Glu	Ile	Glu	Leu	Asp	Asp	Gly	Gly	Tyr					
495								500					505							
aag	ccg	atg	ccc	ttt	gtt	ctc	cg	tct	ggt	gaa	aca	tgg	atg	aaa	aat	1588				
Lys	Arg	Met	Pro	Phe	Val	Leu	Arg	Ser	Gly	Glu	Thr	Trp	Met	Lys	Asn					
510							515					520								
aat	gdc	tct	gac	ttt	tac	ttg	gat	tcc	agc	acc	aaa	gtt	gca	aaa	aat	1636				
Asn	Gly	Ser	Asp	Phe	Tyr	Leu	Asp	Phe	Ser	Thr	Lys	Val	Ala	Lys	Asn					
525						530				535										
aca	aag	gat	act	ggt	gat	gct	ggt	aaa	ggc	act	gct	gag	gcc	ttg	ctt	1684				
Thr	Lys	Asp	Thr	Gly	Asp	Ala	Gly	Lys	Gly	Thr	Ala	Glu	Ala	Leu	Leu					
540						545				550					555					
gaa	aga	ata	gca	gat	cta	gag	gaa	gat	gcc	caa	cga	tct	ctt	atg	cac	1732				
Glu	Arg	Ile	Ala	Asp	Leu	Glu	Glu	Asp	Ala	Gln	Arg	Ser	Leu	Met	His					
560						565								570						
aga	ttc	aat	att	gca	gca	gat	cta	gtt	gac	caa	gcg	aga	gat	aat	gga	1780				
Arg	Phe	Asn	Ile	Ala	Ala	Asp	Leu	Val	Asp	Gln	Ala	Arg	Asp	Asn	Gly					
575						580														
tta	ttg	ggt	att	att	gga	att	ttt	gtt	tgg	att	ggg	ttc	atg	gct	aca	1828				
Leu	Leu	Gly	Ile	Ile	Gly	Ile	Phe	Val	Trp	Ile	Gly	Phe	Met	Ala	Thr					
590						595					600									
agg	caa	cta	ata	tgg	aac	aag	aac	tac	aat	gtg	aag	cca	cgt	gag	ata	1876				
Arg	Gln	Leu	Ile	Trp	Asn	Lys	Asn	Tyr	Asn	Val	Lys	Pro	Arg	Glu	Ile					
605						610					615									
agc	aaa	gcc	caa	gat	agg	ttt	aca	gat	gat	ctt	gag	aat	atg	tac	aga	1924				
Ser	Lys	Ala	Gln	Asp	Arg	Phe	Thr	Asp	Asp	Leu	Glu	Asn	Met	Tyr	Arg					
620						625				630					635					
act	tac	cca	caa	tat	cag	gag	atc	tta	aga	atg	ata	atg	tct	gct	gtt	1972				
Thr	Tyr	Pro	Gln	Tyr	Gln	Glu	Ile	Leu	Arg	Met	Ile	Met	Ser	Ala	Val					
640						645								650						
ggt	cgg	gga	ggt	gaa	ggt	gat	gtt	ggt	caa	cgc	att	cgt	gat	gag	ata	2020				
Gly	Arg	Gly	Gly	Glu	Gly	Asp	Val	Gly	Gln	Arg	Ile	Arg	Asp	Glu	Ile					
655						660								665						
tta	gta	atc	cag	aga	aat	aat	gac	tgc	aaa	ggt	gga	atg	atg	gag	gag	2068				
Leu	Val	Ile	Gln	Arg	Asn	Asn	Asp	Cys	Lys	Gly	Gly	Met	Met	Glu	Glu					
670						675								680						
tgg	cac	cag	aaa	ctg	cac	aac	aat	aca	agc	cca	gat	gat	gta	gtg	atc	2116				
Trp	His	Gln	Lys	Leu	His	Asn	Asn	Thr	Ser	Pro	Asp	Asp	Val	Val	Ile					
685						690														
tgc	cag	gcc	cta	ctt	gat	tat	atc	aag	agt	gat	ttt	gat	act	ggt	gtt	2164				
Cys	Gln	Ala	Leu	Leu	Asp	Tyr	Ile	Lys	Ser	Asp	Phe	Asp	Thr	Gly	Val					
700						705				710					715					
tac	tgg	gac	acc	ttg	aaa	aaa	ggt	ggt	ata	aca	aaa	gag	cgt	cta	ttg	2212				
Tyr	Trp	Asp	Thr	Leu	Lys	Lys	Gly	Gly	Ile	Thr	Lys	Glu	Arg	Leu	Leu					
720						725								730						
agc	tat	gat	cga	ccg	att	cat	tca	gag	cca	aat	ttc	agg	agt	gaa	cag	2260				

BCS 04-5003_Erhöhte Akt. OK1 & R1_SEQUENZPROTOKOLL.ST25
 Ser Tyr Asp Arg Pro Ile His Ser Glu Pro Asn Phe Arg Ser Glu Gln
 735 740 745

aaa gat agc tta ctc cgt gac ttg ggc aat tat atg aga agc ctc aag Lys Asp Ser Leu Leu Arg Asp Leu Gly Asn Tyr Met Arg Ser Leu Lys 750 755 760	2308
gca gtg cat tct ggt gct gat ctt gaa tct gct ata gca act tgc atg Ala Val His Ser Gly Ala Asp Leu Glu Ser Ala Ile Ala Thr Cys Met 765 770 775	2356
gga tac aaa tca gag ggt gaa ggt ttc atg gtt ggt gtt cag att aat Gly Tyr Lys Ser Glu Gly Glu Phe Met Val Gly Val Gln Ile Asn 780 785 790 795	2404
cca gtg aag ggt ttg cca tct gga ttt cct aaa ttg ctt gaa ttt ata Pro Val Lys Gly Leu Pro Ser Gly Phe Pro Lys Leu Leu Glu Phe Ile 800 805 810	2452
ctt gac cat gtt gag gat aaa tca gca aga cca ctt ctt gga ggg tta Leu Asp His Val Glu Asp Lys Ser Ala Arg Pro Leu Leu Gly Gly Leu 815 820 825	2500
ttg gag gct cga gct gaa cta cac cct ttg ctc ctt ggc tct cct gaa Leu Glu Ala Arg Ala Glu Leu His Pro Leu Leu Gly Ser Pro Glu 830 835 840	2548
cgc atg aag gat ctt atc ttt tta gac att gct ctt gat tct act ttc Arg Met Lys Asp Leu Ile Phe Leu Asp Ile Ala Leu Asp Ser Thr Phe 845 850 855	2596
agg aca gca gtc gaa aga tca tat gag gag ctc aat aat gta gaa cca Arg Thr Ala Val Glu Arg Ser Tyr Glu Glu Leu Asn Asn Val Glu Pro 860 865 870 875	2644
gag aaa att atg tac ttc atc agt ctt gtc ctt gaa aat ctt gct tta Glu Lys Ile Met Tyr Phe Ile Ser Leu Val Leu Glu Asn Leu Ala Leu 880 885 890	2692
tcc acc gac gac aat gaa gat atc cta tat tgc tta aag gga tgg aat Ser Thr Asp Asp Asn Glu Asp Ile Leu Tyr Cys Leu Lys Gly Trp Asn 895 900 905	2740
caa gcc gtg gaa atg gct aaa cag aaa aac aac caa tgg gct ctc tat Gln Ala Val Glu Met Ala Lys Gln Lys Asn Asn Gln Trp Ala Leu Tyr 910 915 920	2788
gct aaa gca ttt ctg gac aga acc aga ctt gcc ctt gca agc aag gga Ala Lys Ala Phe Leu Asp Arg Thr Arg Leu Ala Leu Ala Ser Lys Gly 925 930 935	2836
gaa caa tac tat aat ttg atg cag ccc tca gct gaa tat ctt ggc tcg Glu Gln Tyr Tyr Asn Leu Met Gln Pro Ser Ala Glu Tyr Leu Gly Ser 940 945 950 955	2884
tta ctt aac att gac caa tgg gca gtt aat atc ttt aca gaa gaa att Leu Leu Asn Ile Asp Gln Trp Ala Val Asn Ile Phe Thr Glu Glu Ile 960 965 970	2932
att cgt ggt gga tca gct gct acc ctg tct gct ctt ctg aat cgg att Ile Arg Gly Gly Ser Ala Ala Thr Leu Ser Ala Leu Leu Asn Arg Ile 975 980 985	2980
gat cct gtt ctt agg aat gtt gca cag ctt gga agt tgg cag gtt ata Asp Pro Val Leu Arg Asn Val Ala Gln Leu Gly Ser Trp Gln Val Ile 990 995 1000	3028
agc cca gtt gaa gta tca ggt tac att gta gtg gtt gat gaa ttg	3073

BCS 04-5003_Erhöhte Akt. OK1 & R1_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

Ser	Pro	Val	Glu	Val	Ser	Gly	Tyr	Ile	Val	Val	Val	Asp	Glu	Leu	
1005					1010						1015				
ctt	gct	gtt	caa	aac	aaa	tcc	tat	gat	aaa	cca	act	atc	ctt	gtg	3118
Leu	Ala	Val	Gln	Asn	Lys	Ser	Tyr	Asp	Lys	Pro	Thr	Ile	Leu	Val	
1020					1025						1030				
gca	aag	agt	gtc	aag	gga	gag	gaa	gaa	ata	cca	gat	gga	gtt	gtt	3163
Ala	Lys	Ser	Val	Lys	Gly	Gl	Gl	Gl	Ile	Pro	Asp	Gly	Val	Val	
1035					1040						1045				
ggt	gtt	att	aca	cct	gat	atg	cca	gat	gtt	ctc	tcc	cat	gta	tca	3208
Gly	Val	Ile	Thr	Pro	Asp	Met	Pro	Asp	Val	Leu	Ser	His	Val	Ser	
1050					1055						1060				
gtc	cga	gca	agg	aat	tgc	aag	gtt	tta	ttt	gca	aca	tgc	ttt	gat	3253
Val	Arg	Ala	Arg	Asn	Cys	Lys	Val	Leu	Phe	Ala	Thr	Cys	Phe	Asp	
1065					1070						1075				
cct	aac	acc	ttg	tct	gaa	ctc	caa	gga	cat	gat	ggg	aaa	gtg	ttt	3298
Pro	Asn	Thr	Leu	Ser	Glu	Leu	Gln	Gly	His	Asp	Gly	Lys	Val	Phe	
1080					1085						1090				
tcc	ttc	aaa	cct	act	tct	gca	gat	atc	acc	tat	agg	gag	att	cca	3343
Ser	Phe	Lys	Pro	Thr	Ser	Ala	Asp	Ile	Thr	Tyr	Arg	Gl	Ile	Pro	
1095					1100						1105				
gag	agt	gaa	ctg	caa	tca	ggt	tct	cta	aat	gca	gaa	gct	ggc	cag	3388
Glu	Ser	Gl	Leu	Gln	Ser	Gly	Ser	Leu	Asn	Ala	Gl	Ala	Gly	Gln	
1110					1115						1120				
gca	gtg	cca	tct	gtg	tca	tta	gtc	aag	aag	aag	ttt	ctt	gga	aaa	3433
Ala	Val	Pro	Ser	Val	Ser	Leu	Val	Lys	Lys	Lys	Phe	Leu	Gly	Lys	
1125					1130						1135				
tat	gca	ata	tca	gca	gaa	gaa	tcc	tct	gag	gaa	atg	gtt	ggg	gcc	3478
Tyr	Ala	Ile	Ser	Ala	Glu	Gl	Phe	Ser	Gl	Gl	Met	Val	Gly	Ala	
1140					1145						1150				
aag	tct	cgc	aac	gta	gca	tac	ctc	aaa	gga	aaa	gta	ccc	tca	tgg	3523
Lys	Ser	Arg	Asn	Val	Ala	Tyr	Leu	Lys	Gly	Lys	Val	Pro	Ser	Trp	
1155					1160						1165				
gtt	ggt	gtc	cct	aca	tca	gtt	gcg	att	cca	ttt	ggg	acc	ttt	gag	3568
Val	Gly	Val	Pro	Thr	Ser	Val	Ala	Ile	Pro	Phe	Gly	Thr	Phe	Glu	
1170					1175						1180				
aag	gtt	ttg	tct	gat	gaa	atc	aat	aag	gaa	gtc	gcg	caa	acc	ata	3613
Lys	Val	Leu	Ser	Asp	Glu	Il	Asn	Lys	Gl	Val	Ala	Gln	Thr	Ile	
1185					1190						1195				
caa	atg	ctg	aag	gga	aaa	ctt	gct	caa	gat	gat	ttt	agt	gct	cta	3658
Gln	Met	Leu	Lys	Gly	Lys	Leu	Ala	Gln	Asp	Asp	Phe	Ser	Ala	Leu	
1200					1205						1210				
ggc	gaa	ata	cg	aaa	act	gtt	ctc	aat	tta	act	gct	cct	act	caa	3703
Gly	Gl	Ile	Arg	Lys	Thr	Val	Leu	Asn	Leu	Thr	Ala	Pro	Thr	Gln	
1215					1220						1225				
ctg	atc	aag	gaa	ctg	aag	gag	aag	atg	cta	ggc	tct	gga	atg	ccc	3748
Leu	Ile	Lys	Glu	Leu	Lys	Gl	Lys	Met	Leu	Gly	Ser	Gly	Met	Pro	
1230					1235						1240				
tgg	cct	gga	gat	gaa	ggt	gac	caa	cgt	tgg	gag	caa	gca	tgg	atg	3793
Trp	Pro	Gly	Asp	Glu	Gly	Asp	Gln	Arg	Trp	Gl	Gln	Ala	Trp	Met	
1245					1250						1255				
gca	att	aaa	aag	gtt	tgg	gcg	tca	aaa	tgg	aat	gaa	aga	gca	tat	3838

BCS 04-5003_Erhöhte Akt. OK1 & R1_SEQUENZPROTOKOLL_ST25

· <210> 13

<211> 1457

<212> PRT

<213> Oryza sativa

<400> 13

Met Ser Gly Phe Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Glu Arg Cys Ala Leu
1 5 10 15Gly Leu Gly Val His Ala Arg Pro Ala Ser Pro Ser Pro Ala Leu Leu
20 25 30Pro Pro Ala Ala Leu Arg Arg Gly Arg Arg Leu Pro Ala Ala Thr Thr
35 40 45Thr Leu Ala Val Ser Arg Arg Ser Leu Leu Ala Pro Arg Ala Ile Ala
50 55 60Ala Ser Thr Gly Arg Ala Ser Pro Gly Leu Val Gly Arg Phe Thr Leu
65 70 75 80Asp Ala Asn Ser Glu Leu Lys Val Thr Leu Asn Pro Ala Pro Gln Gly
85 90 95Ser Val Val Glu Ile Asn Leu Glu Ala Thr Asn Thr Ser Gly Ser Leu
100 105 110Ile Leu His Trp Gly Ala Leu Arg Pro Asp Arg Gly Glu Trp Leu Leu
115 120 125Pro Ser Arg Lys Pro Asp Gly Thr Thr Val Tyr Lys Asn Arg Ala Leu
130 135 140Arg Thr Pro Phe Ile Lys Ser Gly Asp Asn Ser Thr Leu Lys Ile Glu
145 150 155 160Ile Asp Asp Pro Ala Val Gln Ala Ile Glu Phe Leu Ile Phe Asp Glu
165 170 175Ala Arg Asn Asn Trp Tyr Lys Asn Asn Gln Asn Phe Gln Ile Gln
180 185 190Leu Gln Ala Ser Gln Tyr Gln Gly Gln Gly Thr Ser Thr Ala Thr Ser
195 200 205Ser Thr Val Val Pro Glu Asp Leu Val Gln Ile Gln Ser Tyr Leu Arg
210 215 220Trp Glu Arg Lys Gly Lys Gln Ser Tyr Thr Pro Glu Gln Glu Lys Glu
225 230 235 240Glu Tyr Glu Ala Ala Arg Thr Glu Leu Ile Glu Glu Leu Asn Lys Gly
245 250 255

BCS 04-5003_Erhöhte Akt. OK1 & R1_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

Val Ser Leu Glu Lys Leu Arg Ala Lys Leu Thr Lys Thr Pro Glu Ala
260 265 270

Thr Asp Ser Asn Ala Pro Ala Ser Glu Ser Thr Val Thr Thr Lys Val
275 280 285

Pro Glu Glu Leu Val Gln Val Gln Ala Tyr Ile Arg Trp Glu Lys Ala
290 295 300

Gly Lys Pro Asn Tyr Ala Pro Glu Lys Gln Leu Val Glu Phe Glu Glu
305 310 315 320

Ala Arg Lys Glu Leu Gln Ser Glu Leu Asp Lys Gly Thr Ser Val Glu
325 330 335

Gln Leu Arg Asn Lys Ile Leu Lys Gly Asn Ile Glu Thr Lys Val Ser
340 345 350

Lys Gln Leu Lys Asp Lys Lys Tyr Phe Ser Val Glu Arg Ile Gln Arg
355 360 365

Lys Lys Arg Asp Ile Val Gln Leu Leu Lys Lys His Lys Pro Thr Val
370 375 380

Met Glu Ala Gln Val Glu Thr Pro Lys Gln Pro Thr Val Leu Asp Leu
385 390 395 400

Phe Thr Lys Ser Leu Gln Glu Gln Asp Asn Cys Glu Val Leu Ser Arg
405 410 415

Lys Leu Phe Lys Phe Gly Asp Lys Glu Ile Leu Gly Ile Thr Thr Val
420 425 430

Ala Leu Gly Lys Thr Lys Val His Leu Ala Thr Asn Tyr Met Glu Pro
435 440 445

Leu Ile Leu His Trp Ala Leu Ser Lys Glu Asn Gly Glu Trp Gln Ala
450 455 460

Pro Pro Ser Ser Ile Leu Pro Ser Gly Ser Ser Leu Leu Asp Lys Ala
465 470 475 480

Cys Glu Thr Ser Phe Ser Glu Tyr Glu Leu Asn Gly Leu His Cys Gln
485 490 495

Val Val Glu Ile Glu Leu Asp Asp Gly Gly Tyr Lys Arg Met Pro Phe
500 505 510

Val Leu Arg Ser Gly Glu Thr Trp Met Lys Asn Asn Gly Ser Asp Phe
515 520 525

BCS 04-5003_Erhöhte Akt. OK1 & R1_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

Tyr Leu Asp Phe Ser Thr Lys Val Ala Lys Asn Thr Lys Asp Thr Gly
530 535 540

Asp Ala Gly Lys Gly Thr Ala Glu Ala Leu Leu Glu Arg Ile Ala Asp
545 550 555 560

Leu Glu Glu Asp Ala Gln Arg Ser Leu Met His Arg Phe Asn Ile Ala
565 570 575

Ala Asp Leu Val Asp Gln Ala Arg Asp Asn Gly Leu Leu Gly Ile Ile
580 585 590

Gly Ile Phe Val Trp Ile Gly Phe Met Ala Thr Arg Gln Leu Ile Trp
595 600 605

Asn Lys Asn Tyr Asn Val Lys Pro Arg Glu Ile Ser Lys Ala Gln Asp
610 615 620

Arg Phe Thr Asp Asp Leu Glu Asn Met Tyr Arg Thr Tyr Pro Gln Tyr
625 630 635 640

Gln Glu Ile Leu Arg Met Ile Met Ser Ala Val Gly Arg Gly Glu
645 650 655

Gly Asp Val Gly Gln Arg Ile Arg Asp Glu Ile Leu Val Ile Gln Arg
660 665 670

Asn Asn Asp Cys Lys Gly Gly Met Met Glu Glu Trp His Gln Lys Leu
675 680 685

His Asn Asn Thr Ser Pro Asp Asp Val Val Ile Cys Gln Ala Leu Leu
690 695 700

Asp Tyr Ile Lys Ser Asp Phe Asp Thr Gly Val Tyr Trp Asp Thr Leu
705 710 715 720

Lys Lys Gly Gly Ile Thr Lys Glu Arg Leu Leu Ser Tyr Asp Arg Pro
725 730 735

Ile His Ser Glu Pro Asn Phe Arg Ser Glu Gln Lys Asp Ser Leu Leu
740 745 750

Arg Asp Leu Gly Asn Tyr Met Arg Ser Leu Lys Ala Val His Ser Gly
755 760 765

Ala Asp Leu Glu Ser Ala Ile Ala Thr Cys Met Gly Tyr Lys Ser Glu
770 775 780

Gly Glu Gly Phe Met Val Gly Val Gln Ile Asn Pro Val Lys Gly Leu
785 790 795 800

BCS 04-5003_Erhöhte Akt. OKI & R1_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

Pro Ser Gly Phe Pro Lys Leu Leu Glu Phe Ile Leu Asp His Val Glu
805 810 815

Asp Lys Ser Ala Arg Pro Leu Leu Gly Gly Leu Leu Glu Ala Arg Ala
820 825 830

Glu Leu His Pro Leu Leu Gly Ser Pro Glu Arg Met Lys Asp Leu
835 840 845

Ile Phe Leu Asp Ile Ala Leu Asp Ser Thr Phe Arg Thr Ala Val Glu
850 855 860

Arg Ser Tyr Glu Glu Leu Asn Asn Val Glu Pro Glu Lys Ile Met Tyr
865 870 875 880

Phe Ile Ser Leu Val Leu Glu Asn Leu Ala Leu Ser Thr Asp Asp Asn
885 890 895

Glu Asp Ile Leu Tyr Cys Leu Lys Gly Trp Asn Gln Ala Val Glu Met
900 905 910

Ala Lys Gln Lys Asn Asn Gln Trp Ala Leu Tyr Ala Lys Ala Phe Leu
915 920 925

Asp Arg Thr Arg Leu Ala Leu Ala Ser Lys Gly Glu Gln Tyr Tyr Asn
930 935 940

Leu Met Gln Pro Ser Ala Glu Tyr Leu Gly Ser Leu Leu Asn Ile Asp
945 950 955 960

Gln Trp Ala Val Asn Ile Phe Thr Glu Glu Ile Ile Arg Gly Gly Ser
965 970 975

Ala Ala Thr Leu Ser Ala Leu Leu Asn Arg Ile Asp Pro Val Leu Arg
980 985 990

Asn Val Ala Gln Leu Gly Ser Trp Gln Val Ile Ser Pro Val Glu Val
995 1000 1005

Ser Gly Tyr Ile Val Val Val Asp Glu Leu Leu Ala Val Gln Asn
1010 1015 1020

Lys Ser Tyr Asp Lys Pro Thr Ile Leu Val Ala Lys Ser Val Lys
1025 1030 1035

Gly Glu Glu Glu Ile Pro Asp Gly Val Val Gly Val Ile Thr Pro
1040 1045 1050

Asp Met Pro Asp Val Leu Ser His Val Ser Val Arg Ala Arg Asn
1055 1060 1065

BCS 04-5003_Erhöhte Akt. OK1 & R1_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

Cys Lys Val Leu Phe Ala Thr Cys Phe Asp Pro Asn Thr Leu Ser
1070 1075 1080

Glu Leu Gln Gly His Asp Gly Lys Val Phe Ser Phe Lys Pro Thr
1085 1090 1095

Ser Ala Asp Ile Thr Tyr Arg Glu Ile Pro Glu Ser Glu Leu Gln
1100 1105 1110

Ser Gly Ser Leu Asn Ala Glu Ala Gly Gln Ala Val Pro Ser Val
1115 1120 1125

Ser Leu Val Lys Lys Phe Leu Gly Lys Tyr Ala Ile Ser Ala
1130 1135 1140

Glu Glu Phe Ser Glu Glu Met Val Gly Ala Lys Ser Arg Asn Val
1145 1150 1155

Ala Tyr Leu Lys Gly Lys Val Pro Ser Trp Val Gly Val Pro Thr
1160 1165 1170

Ser Val Ala Ile Pro Phe Gly Thr Phe Glu Lys Val Leu Ser Asp
1175 1180 1185

Glu Ile Asn Lys Glu Val Ala Gln Thr Ile Gln Met Leu Lys Gly
1190 1195 1200

Lys Leu Ala Gln Asp Asp Phe Ser Ala Leu Gly Glu Ile Arg Lys
1205 1210 1215

Thr Val Leu Asn Leu Thr Ala Pro Thr Gln Leu Ile Lys Glu Leu
1220 1225 1230

Lys Glu Lys Met Leu Gly Ser Gly Met Pro Trp Pro Gly Asp Glu
1235 1240 1245

Gly Asp Gln Arg Trp Glu Gln Ala Trp Met Ala Ile Lys Lys Val
1250 1255 1260

Trp Ala Ser Lys Trp Asn Glu Arg Ala Tyr Phe Ser Thr Arg Lys
1265 1270 1275

Val Lys Leu Asp His Asp Tyr Leu Ser Met Ala Val Leu Val Gln
1280 1285 1290

Glu Ile Val Asn Ala Asp Tyr Ala Phe Val Ile His Thr Thr Asn
1295 1300 1305

Pro Ser Ser Gly Asp Ser Ser Glu Ile Tyr Ala Glu Val Val Lys
1310 1315 1320

BCS 04-5003_Erhöhte Akt. OK1 & R1_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

Gly Leu Gly Glu Thr Leu Val Gly Ala Tyr Pro Gly Arg Ala Met
1325 1330 1335

Ser Phe Val Cys Lys Lys Asn Asp Leu Asp Ser Pro Lys Val Leu
1340 1345 1350

Gly Phe Pro Ser Lys Pro Ile Gly Val Phe Ile Lys Arg Ser Ile
1355 1360 1365

Ile Phe Arg Ser Asp Ser Asn Gly Glu Asp Leu Glu Gly Tyr Ala
1370 1375 1380

Gly Ala Arg Leu Tyr Asp Ser Val Pro Met Asp Glu Glu Asp Glu
1385 1390 1395

Val Ile Val Asp Tyr Asn Asn Gly Pro Leu Ile Thr Asp Gln Gly
1400 1405 1410

Phe Gln Lys Ser Asn Leu Pro Ser Ile Ala Pro Ala Gly His Ala
1415 1420 1425

Ile Glu Glu Leu Tyr Gly Ser Pro Gln Asp Val Glu Gly Ala Val
1430 1435 1440

Lys Glu Gly Lys Leu Tyr Val Val Gln Thr Arg Pro Gln Met
1445 1450 1455

<210> 14

<211> 4745

<212> DNA

<213> Glycine max

<220>

<221> CDS

<222> (103)..(4482)

<223>

<300>

<308> NCBI / AR400815

<309> 2003-12-18

<400> 14
gcaccaggcct ctccccatTT tcacgtgatt cccaatctca cactcttctc acaccTTcaa 60
Seite 67

BCS 04-5003_Erhöhte Akt. OK1 & R1_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

ccgattcaac gcaacaaagt gataaaagtgt ggatccggga ag atg agc cag agt Ile Phe His Gln Thr Val Leu Cys Gln Thr Gln Thr Val Ala Glu His 5 10 15 20	Met Ser Gln Ser 1	114
caa agt aag gtt agt tcc ttg gag gtg agt gcg aac aaa gga aag aag Gln Ser Lys Val Ser Ser Leu Glu Val Ser Ala Asn Lys Gly Lys Lys 25 30 35		210
aac ctc ttt ttg gct cct aca aat ttt cgc ggg agc agg ctg tgg tgg Asn Leu Phe Leu Ala Pro Thr Asn Phe Arg Gly Ser Arg Arg Leu Cys Val 40 45 50		258
agg aaa cgc aaa tta acc atg gga agg cac cac cac cgc cac gtt gac Arg Lys Arg Lys Leu Thr Met Gly Arg His His His Arg His Val Asp 55 60 65		306
gct gtt cca cgc gct gtt tta acc acc aat ctg gct tct gag ctt tct Ala Val Pro Arg Ala Val Leu Thr Thr Asn Leu Ala Ser Glu Leu Ser 70 75 80		354
ggg aag ttc aac ctt gac gga aat att gag ttg cag att gct gtt agt Gly Lys Phe Asn Leu Asp Gly Asn Ile Glu Leu Gln Ile Ala Val Ser 85 90 95 100		402
tct tca gaa cca gga gct gca aga caa gta gat ttt aag gtt tca tat Ser Ser Glu Pro Gly Ala Ala Arg Gln Val Asp Phe Lys Val Ser Tyr 105 110 115		450
aat agt gag tct ctg ctt tta cat tgg gga gtt gtg cgt gat cag cca Asn Ser Glu Ser Leu Leu Leu His Trp Gly Val Val Arg Asp Gln Pro 120 125 130		498
ggg aag tgg gtt ctt cct tct cgt cac cca gat gga act aaa aat tat Gly Lys Trp Val Leu Pro Ser Arg His Pro Asp Gly Thr Lys Asn Tyr 135 140 145		546
aag agc aga gct ctt aga act cct ttt gtg aaa tcc gac tca gga tct Lys Ser Arg Ala Leu Arg Thr Pro Phe Val Lys Ser Asp Ser Gly Ser 150 155 160		594
ttc ctt aaa ata gaa att gac gat cct gct gca caa gcc att gag ttc Phe Leu Lys Ile Glu Ile Asp Asp Pro Ala Ala Gln Ala Ile Glu Phe 165 170 175 180		642
ctc ata ctt gat gag gct aag aat aag tgg ttt aag aat aat ggt gag Leu Ile Leu Asp Glu Ala Lys Asn Lys Trp Phe Lys Asn Asn Gly Glu 185 190 195		690
aac ttt cac atc aag tta cca gta aaa agc aag cta tct caa gaa gtt Asn Phe His Ile Lys Leu Pro Val Lys Ser Lys Leu Ser Gln Glu Val 200 205 210		738
tca gtt cct gaa gac ctt gta cag att caa gca tat ctt agg tgg gaa Ser Val Pro Glu Asp Leu Val Gln Ile Gln Ala Tyr Leu Arg Trp Glu 215 220 225		786
cga aag ggt aag cag atg tac act cca gag caa gag aag gag gaa tat Arg Lys Gly Lys Gln Met Tyr Thr Pro Glu Gln Glu Lys Glu Glu Tyr 230 235 240		834
gaa gca gct cgg aat gaa cta ttg gag gaa gta gcc agg ggt act tct Glu Ala Ala Arg Asn Glu Leu Leu Glu Glu Val Ala Arg Gly Thr Ser 245 250 255 260		882

BCS 04-5003_Erhöhte Akt. OK1 & RI_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

gtg cga gat ctc cat gca agg tta act aag aaa act aaa gct gcc gaa	930
Val Arg Asp Leu His Ala Arg Leu Thr Lys Lys Thr Lys Ala Ala Glu	
265 270 275	
gta aag gag cct tct gtt tct gaa aca aag acc atc cct gat gaa ctt	978
Val Lys Glu Pro Ser Val Ser Glu Thr Lys Thr Ile Pro Asp Glu Leu	
280 285 290	
gta cag att caa gct ttt ata cga tgg gaa aaa gct ggg aag cct aac	1026
Val Gln Ile Gln Ala Phe Ile Arg Trp Glu Lys Ala Gly Lys Pro Asn	
295 300 305	
tac tct cgg gaa caa caa ctt atg gaa ttt gag gaa gca aga aaa gaa	1074
Tyr Ser Arg Glu Gln Gln Leu Met Glu Phe Glu Glu Ala Arg Lys Glu	
310 315 320	
ttg tta gaa gag ctt gag aag ggg gct tct ctg gat gcg ata cgg aag	1122
Leu Leu Glu Glu Leu Glu Lys Gln Ala Ser Leu Asp Ala Ile Arg Lys	
325 330 335 340	
aag att gtc aaa gga gag ata caa act aaa gtt gcc aag caa ttg aaa	1170
Lys Ile Val Lys Gly Glu Ile Gln Thr Lys Val Ala Lys Gln Leu Lys	
345 350 355	
acc aaa aaa tac ttt cgt gct gaa aga ata cag agg aaa aag aga gat	1218
Thr Lys Lys Tyr Phe Arg Ala Glu Arg Ile Gln Arg Lys Lys Arg Asp	
360 365 370	
ttg atg cag ctt atc aac cga aat gtt gca caa aat ata gtt gaa caa	1266
Leu Met Gln Leu Ile Asn Arg Asn Val Ala Gln Asn Ile Val Glu Gln	
375 380 385	
gtt ata gat gct cca aaa gcc ttg aca gta att gaa cat tat gcc aat	1314
Val Ile Asp Ala Pro Lys Ala Leu Thr Val Ile Glu His Tyr Ala Asn	
390 395 400	
gca agg gaa gaa tat gaa agt ggt cct gtt ttg aat aag aca ata tac	1362
Ala Arg Glu Glu Tyr Glu Ser Gln Pro Val Leu Asn Lys Thr Ile Tyr	
405 410 415 420	
aag ctt ggt gat aat tat ctt ctg gtc ctt gtt acc aag gat gct ggc	1410
Lys Leu Gly Asp Asn Tyr Leu Leu Val Leu Val Thr Lys Asp Ala Gly	
425 430 435	
aag att aag gtt cac cta gct aca gac tcg aaa aaa cct ttt aca ctt	1458
Lys Ile Lys Val His Leu Ala Thr Asp Ser Lys Lys Pro Phe Thr Leu	
440 445 450	
cac tgg gcc tta tct aga aca tct gaa gag tgg ttg gta cca cct gaa	1506
His Trp Ala Leu Ser Arg Thr Ser Glu Glu Trp Leu Val Pro Pro Glu	
455 460 465	
act gct ctg ccc cct gga tct gtt act atg aat gag gcc gct gaa aca	1554
Thr Ala Leu Pro Pro Gly Ser Val Thr Met Asn Glu Ala Ala Glu Thr	
470 475 480	
cct ttc aaa gct ggt tct tcg tct cat cct tct tat gag gtc cag tcc	1602
Pro Phe Lys Ala Gly Ser Ser Ser His Pro Ser Tyr Glu Val Gln Ser	
485 490 495 500	
ttg gat ata gag gtt gat gat gat act ttt aaa gga ata cct ttt gtc	1650
Leu Asp Ile Glu Val Asp Asp Asp Thr Phe Lys Gln Ile Pro Phe Val	
505 510 515	
att ctg tcg gat gga gaa tgg ata aag aac aat gga tca aat ttt tat	1698
Ile Leu Ser Asp Gly Glu Trp Ile Lys Asn Asn Gly Ser Asn Phe Tyr	
520 525 530	

BCS 04-5003_Erhöhte Akt. OK1 & R1_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

att gaa ttt ggt ggg aag aag cag aaa cag aag gat ttt ggc aat ggc Ile Glu Phe Gly Gly Lys Lys Gln Lys Gln Lys Asp Phe Gly Asn Gly 535 540 545	1746
aaa ggt aca gcc aag ttc ttg ttg aat aaa ata gca gaa atg gaa agt Lys Gly Thr Ala Lys Phe Leu Leu Asn Lys Ile Ala Glu Met Glu Ser 550 555 560	1794
gag gca caa aag tcc ttc atg cat cga ttt aac att gca tca gat ttg Glu Ala Gln Lys Ser Phe Met His Arg Phe Asn Ile Ala Ser Asp Leu 565 570 575 580	1842
ata gat gaa gcc aaa aat gct ggt caa ctg ggt ctt gcg ggg att ttg Ile Asp Glu Ala Lys Asn Ala Gly Gln Leu Gly Leu Ala Gly Ile Leu 585 590 595	1890
gtg tgg atg aga ttc atg gct aca agg cag ctc ata tgg aac aaa aat Val Trp Met Arg Phe Met Ala Thr Arg Gln Leu Ile Trp Asn Lys Asn 600 605 610	1938
tac aat gtg aag cca cgt gag ata agt aaa gca cag gat agg ctt aca Tyr Asn Val Lys Pro Arg Glu Ile Ser Lys Ala Gln Asp Arg Leu Thr 615 620 625	1986
gac ttg ctc caa gat gtt tat gca aat tat cca cag tat agg gaa att Asp Leu Leu Gln Asp Val Tyr Ala Asn Tyr Pro Gln Tyr Arg Glu Ile 630 635 640	2034
gtg agg atg atc ttg tcc act gtt ggt cgt gga ggt gaa gga gat gtc Val Arg Met Ile Leu Ser Thr Val Gly Arg Gly Gly Glu Gly Asp Val 645 650 655 660	2082
gga cag agg att cgg gat gaa atc ctt gtt atc cag aga aat aat gat Gly Gln Arg Ile Arg Asp Glu Ile Leu Val Ile Gln Arg Asn Asn Asp 665 670 675	2130
tgc aaa ggt gga atg atg gag gaa tgg cac cag aaa tta cac aat aat Cys Lys Gly Met Met Glu Glu Trp His Gln Lys Leu His Asn Asn 680 685 690	2178
act agt cct gat gat gtt gta atc tgt cag gca cta att gat tat ata Thr Ser Pro Asp Asp Val Val Ile Cys Gln Ala Leu Ile Asp Tyr Ile 695 700 705	2226
aat agt gac ttt gat att ggt gtt tac tgg aaa gca ttg aat gac aat Asn Ser Asp Phe Asp Ile Gly Val Tyr Trp Lys Ala Leu Asn Asp Asn 710 715 720	2274
aga ata aca aaa gag cgg ctt ctg agc tat gac cgt gcc atc cat tct Arg Ile Thr Lys Glu Arg Leu Leu Ser Tyr Asp Arg Ala Ile His Ser 725 730 735 740	2322
gaa cca aat ttt agg aga gat cag aag gaa ggt ctt ctg cga gat ctg Glu Pro Asn Phe Arg Arg Asp Gln Lys Glu Gly Leu Leu Arg Asp Leu 745 750 755	2370
gga aac tac atg agg act tta aag gca gtt cat tcc ggt gca gat ctt Gly Asn Tyr Met Arg Thr Leu Lys Ala Val His Ser Gly Ala Asp Leu 760 765 770	2418
gaa tct gct att tca aat tgt atg ggc tac aaa tct gag ggt cag ggc Glu Ser Ala Ile Ser Asn Cys Met Gly Tyr Lys Ser Glu Gly Gln Gly 775 780 785	2466
ttc atg gta ggg gtg aag ata aat cca gtg ccg ggt ttg cct act ggt Phe Met Val Gly Val Lys Ile Asn Pro Val Pro Gly Leu Pro Thr Gly 790 795 800	2514

BCS 04-5003_Erhöhte Akt. OK1 & R1_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

ttt cca gaa tta ctt gag ttt gtc atg gaa cac gtt gaa gag aag aat Phe Pro Glu Leu Leu Glu Phe Val Met Glu His Val Glu Glu Lys Asn 805 810 815 820	2562
gtt gaa cca ctt ctt gag ggg ttg ctt gag gct cgt cag gaa ctc caa Val Glu Pro Leu Leu Glu Gly Leu Leu Glu Ala Arg Gln Glu Leu Gln 825 830 835	2610
cca tca ctc agt aaa tcc caa agt cgt ctg aaa gat ctt ata ttt ttg Pro Ser Leu Ser Lys Ser Gln Ser Arg Leu Lys Asp Leu Ile Phe Leu 840 845 850	2658
gat gtt gcc ctt gat tct aca gtt aga aca gca gtg gaa agg agt tat Asp Val Ala Leu Asp Ser Thr Val Arg Thr Ala Val Glu Arg Ser Tyr 855 860 865	2706
gag gaa tta aac aat gct gga cct gag aaa ata atg tac ttc att agc Glu Glu Leu Asn Asn Ala Gly Pro Glu Lys Ile Met Tyr Phe Ile Ser 870 875 880	2754
ttg gtt ctt gaa aat ctc gca ctt tca tcg gat gac aat gaa gat ctt Leu Val Leu Glu Asn Leu Ala Leu Ser Ser Asp Asp Asn Glu Asp Leu 885 890 895 900	2802
atc tac tgt ttg aag gga tgg gat gtt gcc tta agc atg tgc aag att Ile Tyr Cys Leu Lys Gly Trp Asp Val Ala Leu Ser Met Cys Lys Ile 905 910 915	2850
aaa gat act cat tgg gca ttg tac gca aaa tca gtc ctt gac aga acc Lys Asp Thr His Trp Ala Leu Tyr Ala Lys Ser Val Leu Asp Arg Thr 920 925 930	2898
cgt ctt gca cta aca aac aag gct cat tta tac cag gaa att ctg caa Arg Leu Ala Leu Thr Asn Lys Ala His Leu Tyr Gln Glu Ile Leu Gln 935 940 945	2946
cca tcg gca gaa tat ctt gga tca ctg ctt ggc gtg gac aaa tgg gcc Pro Ser Ala Glu Tyr Leu Gly Ser Leu Leu Val Asp Lys Trp Ala 950 955 960	2994
gtg gaa ata ttt act gaa gaa att atc cgt gct gga tct gct gct tct Val Glu Ile Phe Thr Glu Glu Ile Ile Arg Ala Gly Ser Ala Ala Ser 965 970 975 980	3042
ttg tct act ctt cta aat cga ctg gat cct gtc ctc cga aag aca gct Leu Ser Thr Leu Leu Asn Arg Leu Asp Pro Val Leu Arg Lys Thr Ala 985 990 995	3090
cat ctt gga agc tgg cag gtt att agt cca gtt gaa act gtt gga His Leu Gly Ser Trp Gln Val Ile Ser Pro Val Glu Thr Val Gly 1000 1005 1010	3135
tat gtt gag gtt gta gat gag ttg ctt act gtt caa aac aaa tca Tyr Val Glu Val Val Asp Glu Leu Leu Thr Val Gln Asn Lys Ser 1015 1020 1025	3180
tat gag cga cct aca att ttg ata gcc aat agt gtc aaa gga gag Tyr Glu Arg Pro Thr Ile Leu Ile Ala Asn Ser Val Lys Gly Glu 1030 1035 1040	3225
gaa gaa att cca gat ggt aca gtt gct gtc ctg aca cct gat atg Glu Glu Ile Pro Asp Gly Thr Val Ala Val Leu Thr Pro Asp Met 1045 1050 1055	3270
cct gat gtc cta tcc cat gtt tct gta cga gca aga aat agc aag Pro Asp Val Leu Ser His Val Ser Val Arg Ala Arg Asn Ser Lys 1060 1065 1070	3315

BCS 04-5003_Erhöhte Akt. OK1 & R1_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

gtg tgg ttt gct aca tgc ttt gat ccc	aat atc ctg gct aac ctc	3360
Val Cys Phe Ala Thr Cys Phe Asp Pro	Asn Ile Leu Ala Asn Leu	
1075 1080	1085	
caa gaa tat aaa gga aag ctt tta cgc	tta aag cct aca tct gct	3405
Gln Glu Tyr Lys Gly Lys Leu Leu Arg	Leu Lys Pro Thr Ser Ala	
1090 1095	1100	
gat gta gtt tat agt gag gtc aag gag	ggt gag ttt att gat gac	3450
Asp Val Val Tyr Ser Glu Val Lys Glu	Gly Glu Phe Ile Asp Asp	
1105 1110	1115	
aaa tca act caa ctg aaa gat gtt ggt	tct gtg tca ccc ata tct	3495
Lys Ser Thr Gln Leu Lys Asp Val Gly	Ser Val Ser Pro Ile Ser	
1120 1125	1130	
ctg gcc aga aag aag ttt agt ggt aga	tat gct gtc tca tct gaa	3540
Leu Ala Arg Lys Lys Phe Ser Gly Arg	Tyr Ala Val Ser Ser Glu	
1135 1140	1145	
gaa ttc act ggt gaa atg gtt gga gct	aaa tct cgt aat atc tct	3585
Glu Phe Thr Gly Glu Met Val Gly Ala	Lys Ser Arg Asn Ile Ser	
1150 1155	1160	
tat tta aaa ggg aaa gta gct tct tgg	att gga att cct acc tca	3630
Tyr Leu Lys Gly Lys Val Ala Ser Trp	Ile Gly Ile Pro Thr Ser	
1165 1170	1175	
gtt gcc ata cca ttt gga gtt ttt gaa	cat gtt ctt tct gat aaa	3675
Val Ala Ile Pro Phe Gly Val Phe Glu	His Val Leu Ser Asp Lys	
1180 1185	1190	
cca aac cag gca gtg gct gag agg gtc	aat aat ttg aaa aag aag	3720
Pro Asn Gln Ala Val Ala Glu Arg Val	Asn Asn Leu Lys Lys Lys	
1195 1200	1205	
tta act gag gga gac ttc agt gtt ctc	aag gag att cgt gaa aca	3765
Leu Thr Glu Gly Asp Phe Ser Val Leu	Lys Glu Ile Arg Glu Thr	
1210 1215	1220	
gtt cta cag ttg aat gca cca tcc cag	ttg gta gag gag ttg aaa	3810
Val Leu Gln Leu Asn Ala Pro Ser Gln	Leu Val Glu Glu Leu Lys	
1225 1230	1235	
act aaa atg aag agt tct gga atg ccg	tgg ccg ggt gat gaa ggt	3855
Thr Lys Met Lys Ser Ser Gly Met Pro	Trp Pro Gly Asp Glu Gly	
1240 1245	1250	
gaa caa cga tgg gaa caa gct tgg ata	gct ata aaa aag gta tgg	3900
Glu Gln Arg Trp Glu Gln Ala Trp Ile	Ala Ile Lys Lys Val Trp	
1255 1260	1265	
ggc tca aag tgg aat gaa aga gca tac	ttc agc aca aga aaa gtg	3945
Gly Ser Lys Trp Asn Glu Arg Ala Tyr	Phe Ser Thr Arg Lys Val	
1270 1275	1280	
aaa ctc gac cac gaa tat ctt tcc atg	gca gtc ctg gtt cag gaa	3990
Lys Leu Asp His Glu Tyr Leu Ser Met	Ala Val Leu Val Gln Glu	
1285 1290	1295	
gtg ata aat gct gac tat gct ttt gtc	atc cac aca act aac cct	4035
Val Ile Asn Ala Asp Tyr Ala Phe Val	Ile His Thr Thr Asn Pro	
1300 1305	1310	
gcc tct gga gat tca tcg gaa ata tat	gct gag gtg gta aag gga	4080
Ala Ser Gly Asp Ser Ser Glu Ile Tyr	Ala Glu Val Val Lys Gly	
1315 1320	1325	

BCS 04-5003_Erhöhte Akt. OK1 & RI_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

ctt gga gaa aca	ctg gtt gga gct tat	cct ggt cgt gct ttg agt	4125	
Leu Gly Glu Thr	Leu Val Gly Ala Tyr	Pro Gly Arg Ala Leu Ser		
1330	1335	1340		
ttt atc tgc aag	aaa cgt gat ttg aac	tct cct cag gtc ttg ggt	4170	
Phe Ile Cys Lys	Lys Arg Asp Leu Asn	Ser Pro Gln Val Leu Gly		
1345	1350	1355		
tat cct agc aaa	cct gtc ggc cta ttt	ata aga cag tca att att	4215	
Tyr Pro Ser Lys	Pro Val Gly Leu Phe	Ile Arg Gln Ser Ile Ile		
1360	1365	1370		
tcc cga tct gat	tcc aat ggt gaa gat	cta gaa ggt tat gct ggt	4260	
Phe Arg Ser Asp	Ser Asn Gly Glu Asp	Leu Glu Gly Tyr Ala Gly		
1375	1380	1385		
gca ggt ctt tat	gac agt gtg cca atg	gat gaa gcc gag aag gtg	4305	
Ala Gly Leu Tyr	Asp Ser Val Pro Met	Asp Glu Ala Glu Lys Val		
1390	1395	1400		
gtg ctt gat tat	tca tca gac aaa ctg	atc ctt gat ggt agt ttt	4350	
Val Leu Asp Tyr	Ser Ser Asp Lys Leu	Ile Leu Asp Gly Ser Phe		
1405	1410	1415		
cgc cag tca atc	ttg tcc agc att gcc	cgt gca gga aat gaa att	4395	
Arg Gln Ser Ile	Leu Ser Ser Ile Ala	Arg Ala Gly Asn Glu Ile		
1420	1425	1430		
gaa gag ttg tat	ggc act cct cag gac	att gaa ggt gtc atc aag	4440	
Glu Glu Leu Tyr	Gly Thr Pro Gln Asp	Ile Glu Gly Val Ile Lys		
1435	1440	1445		
gat ggc aaa gtc	tat gtt gtc cag acc	aga cca caa atg taa	4482	
Asp Gly Lys Val	Tyr Val Val Gln Thr	Arg Pro Gln Met		
1450	1455			
acttgcatac ccatgtcttc taagccacct acctcaacta tgttcatccc cgagcaacac				4542
gtcgtttcaa acgtggccgt ggcagttct gtgagttcaa gagtaacccc cggattacca				4602
aacatggcct tatagattta ttacatgata tattgaaaat taaggaataa gtgtataaaa				4662
acggaatatt gtaaattaag aaaaatttag acggtcttat atattcttt tccctactat				4722
aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaa aaa				4745

<210> 15

<211> 1459

<212> PRT

<213> Glycine max

<400> 15

Met Ser Gln Ser Ile Phe His Gln Thr Val Leu Cys Gln Thr Gln Thr
1 5 10 15Val Ala Glu His Gln Ser Lys Val Ser Ser Leu Glu Val Ser Ala Asn
20 25 30

BCS 04-5003_Erhöhte Akt. OK1 & R1_SEQUENZPROTOKOLL.ST25
Lys Gly Lys Lys Asn Leu Phe Leu Ala Pro Thr Asn Phe Arg Gly Ser
35 40 45

Arg Leu Cys Val Arg Lys Arg Lys Leu Thr Met Gly Arg His His His
50 55 60

Arg His Val Asp Ala Val Pro Arg Ala Val Leu Thr Thr Asn Leu Ala
65 70 75 80

Ser Glu Leu Ser Gly Lys Phe Asn Leu Asp Gly Asn Ile Glu Leu Gln
85 90 95

Ile Ala Val Ser Ser Ser Glu Pro Gly Ala Ala Arg Gln Val Asp Phe
100 105 110

Lys Val Ser Tyr Asn Ser Glu Ser Leu Leu Leu His Trp Gly Val Val
115 120 125

Arg Asp Gln Pro Gly Lys Trp Val Leu Pro Ser Arg His Pro Asp Gly
130 135 140

Thr Lys Asn Tyr Lys Ser Arg Ala Leu Arg Thr Pro Phe Val Lys Ser
145 150 155 160

Asp Ser Gly Ser Phe Leu Lys Ile Glu Ile Asp Asp Pro Ala Ala Gln
165 170 175

Ala Ile Glu Phe Leu Ile Leu Asp Glu Ala Lys Asn Lys Trp Phe Lys
180 185 190

Asn Asn Gly Glu Asn Phe His Ile Lys Leu Pro Val Lys Ser Lys Leu
195 200 205

Ser Gln Glu Val Ser Val Pro Glu Asp Leu Val Gln Ile Gln Ala Tyr
210 215 220

Leu Arg Trp Glu Arg Lys Gly Lys Gln Met Tyr Thr Pro Glu Gln Glu
225 230 235 240

Lys Glu Glu Tyr Glu Ala Ala Arg Asn Glu Leu Leu Glu Glu Val Ala
245 250 255

Arg Gly Thr Ser Val Arg Asp Leu His Ala Arg Leu Thr Lys Lys Thr
260 265 270

Lys Ala Ala Glu Val Lys Glu Pro Ser Val Ser Glu Thr Lys Thr Ile
275 280 285

Pro Asp Glu Leu Val Gln Ile Gln Ala Phe Ile Arg Trp Glu Lys Ala
290 295 300

BCS 04-5003_Erhöhte Akt. OK1 & R1_SEQUENZPROTOKOLL ST25

Gly Lys Pro Asn Tyr Ser Arg Glu Gln Gln Leu Met Glu Phe Glu Glu
305 310 315 320

Ala Arg Lys Glu Leu Leu Glu Leu Glu Lys Gly Ala Ser Leu Asp
325 330 335

Ala Ile Arg Lys Lys Ile Val Lys Gly Glu Ile Gln Thr Lys Val Ala
340 345 350

Lys Gln Leu Lys Thr Lys Lys Tyr Phe Arg Ala Glu Arg Ile Gln Arg
355 360 365

Lys Lys Arg Asp Leu Met Gln Leu Ile Asn Arg Asn Val Ala Gln Asn
370 375 380

Ile Val Glu Gln Val Ile Asp Ala Pro Lys Ala Leu Thr Val Ile Glu
385 390 395 400

His Tyr Ala Asn Ala Arg Glu Glu Tyr Glu Ser Gly Pro Val Leu Asn
405 410 415

Lys Thr Ile Tyr Lys Leu Gly Asp Asn Tyr Leu Leu Val Leu Val Thr
420 425 430

Lys Asp Ala Gly Lys Ile Lys Val His Leu Ala Thr Asp Ser Lys Lys
435 440 445

Pro Phe Thr Leu His Trp Ala Leu Ser Arg Thr Ser Glu Glu Trp Leu
450 455 460

Val Pro Pro Glu Thr Ala Leu Pro Pro Gly Ser Val Thr Met Asn Glu
465 470 475 480

Ala Ala Glu Thr Pro Phe Lys Ala Gly Ser Ser Ser His Pro Ser Tyr
485 490 495

Glu Val Gln Ser Leu Asp Ile Glu Val Asp Asp Asp Thr Phe Lys Gly
500 505 510

Ile Pro Phe Val Ile Leu Ser Asp Gly Glu Trp Ile Lys Asn Asn Gly
515 520 525

Ser Asn Phe Tyr Ile Glu Phe Gly Gly Lys Gln Lys Gln Lys Asp
530 535 540

Phe Gly Asn Gly Lys Gly Thr Ala Lys Phe Leu Leu Asn Lys Ile Ala
545 550 555 560

Glu Met Glu Ser Glu Ala Gln Lys Ser Phe Met His Arg Phe Asn Ile
565 570 575

BCS 04-5003_Erhöhte Akt. OK1 & R1_SEQUENZPROTOKOLL.ST25
Ala Ser Asp Leu Ile Asp Glu Ala Lys Asn Ala Gly Gln Leu Gly Leu
580 585 590

Ala Gly Ile Leu Val Trp Met Arg Phe Met Ala Thr Arg Gln Leu Ile
595 600 605

Trp Asn Lys Asn Tyr Asn Val Lys Pro Arg Glu Ile Ser Lys Ala Gln
610 615 620

Asp Arg Leu Thr Asp Leu Leu Gln Asp Val Tyr Ala Asn Tyr Pro Gln
625 630 635 640

Tyr Arg Glu Ile Val Arg Met Ile Leu Ser Thr Val Gly Arg Gly Gly
645 650 655

Glu Gly Asp Val Gly Gln Arg Ile Arg Asp Glu Ile Leu Val Ile Gln
660 665 670

Arg Asn Asn Asp Cys Lys Gly Gly Met Met Glu Glu Trp His Gln Lys
675 680 685

Leu His Asn Asn Thr Ser Pro Asp Asp Val Val Ile Cys Gln Ala Leu
690 695 700

Ile Asp Tyr Ile Asn Ser Asp Phe Asp Ile Gly Val Tyr Trp Lys Ala
705 710 715 720

Leu Asn Asp Asn Arg Ile Thr Lys Glu Arg Leu Leu Ser Tyr Asp Arg
725 730 735

Ala Ile His Ser Glu Pro Asn Phe Arg Arg Asp Gln Lys Glu Gly Leu
740 745 750

Leu Arg Asp Leu Gly Asn Tyr Met Arg Thr Leu Lys Ala Val His Ser
755 760 765

Gly Ala Asp Leu Glu Ser Ala Ile Ser Asn Cys Met Gly Tyr Lys Ser
770 775 780

Glu Gly Gln Gly Phe Met Val Gly Val Lys Ile Asn Pro Val Pro Gly
785 790 795 800

Leu Pro Thr Gly Phe Pro Glu Leu Leu Glu Phe Val Met Glu His Val
805 810 815

Glu Glu Lys Asn Val Glu Pro Leu Leu Glu Gly Leu Leu Glu Ala Arg
820 825 830

Gln Glu Leu Gln Pro Ser Leu Ser Lys Ser Gln Ser Arg Leu Lys Asp
835 840 845

BCS 04-5003_Erhöhte Akt. OK1 & R1_SEQUENZPROTOKOLL_ST25
Leu Ile Phe Leu Asp Val Ala Leu Asp Ser Thr Val Arg Thr Ala Val
850 855 860
Glu Arg Ser Tyr Glu Glu Leu Asn Asn Ala Gly Pro Glu Lys Ile Met
865 870 875 880
Tyr Phe Ile Ser Leu Val Leu Glu Asn Leu Ala Leu Ser Ser Asp Asp
885 890 895
Asn Glu Asp Leu Ile Tyr Cys Leu Lys Gly Trp Asp Val Ala Leu Ser
900 905 910
Met Cys Lys Ile Lys Asp Thr His Trp Ala Leu Tyr Ala Lys Ser Val
915 920 925
Leu Asp Arg Thr Arg Leu Ala Leu Thr Asn Lys Ala His Leu Tyr Gln
930 935 940
Glu Ile Leu Gln Pro Ser Ala Glu Tyr Leu Gly Ser Leu Leu Gly Val
945 950 955 960
Asp Lys Trp Ala Val Glu Ile Phe Thr Glu Glu Ile Ile Arg Ala Gly
965 970 975
Ser Ala Ala Ser Leu Ser Thr Leu Leu Asn Arg Leu Asp Pro Val Leu
980 985 990
Arg Lys Thr Ala His Leu Gly Ser Trp Gln Val Ile Ser Pro Val Glu
995 1000 1005
Thr Val Gly Tyr Val Glu Val Val Asp Glu Leu Leu Thr Val Gln
1010 1015 1020
Asn Lys Ser Tyr Glu Arg Pro Thr Ile Leu Ile Ala Asn Ser Val
1025 1030 1035
Lys Gly Glu Glu Glu Ile Pro Asp Gly Thr Val Ala Val Leu Thr
1040 1045 1050
Pro Asp Met Pro Asp Val Leu Ser His Val Ser Val Arg Ala Arg
1055 1060 1065
Asn Ser Lys Val Cys Phe Ala Thr Cys Phe Asp Pro Asn Ile Leu
1070 1075 1080
Ala Asn Leu Gln Glu Tyr Lys Gly Lys Leu Leu Arg Leu Lys Pro
1085 1090 1095
Thr Ser Ala Asp Val Val Tyr Ser Glu Val Lys Glu Gly Glu Phe
1100 1105 1110

BCS 04-5003_Erhöhte Akt. OK1 & R1_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

Ile Asp Asp Lys Ser Thr Gln Leu Lys Asp Val Gly Ser Val Ser
 1115 1120 1125

Pro Ile Ser Leu Ala Arg Lys Lys Phe Ser Gly Arg Tyr Ala Val
 1130 1135 1140

Ser Ser Glu Glu Phe Thr Gly Glu Met Val Gly Ala Lys Ser Arg
 1145 1150 1155

Asn Ile Ser Tyr Leu Lys Gly Lys Val Ala Ser Trp Ile Gly Ile
 1160 1165 1170

Pro Thr Ser Val Ala Ile Pro Phe Gly Val Phe Glu His Val Leu
 1175 1180 1185

Ser Asp Lys Pro Asn Gln Ala Val Ala Glu Arg Val Asn Asn Leu
 1190 1195 1200

Lys Lys Lys Leu Thr Glu Gly Asp Phe Ser Val Leu Lys Glu Ile
 1205 1210 1215

Arg Glu Thr Val Leu Gln Leu Asn Ala Pro Ser Gln Leu Val Glu
 1220 1225 1230

Glu Leu Lys Thr Lys Met Lys Ser Ser Gly Met Pro Trp Pro Gly
 1235 1240 1245

Asp Glu Gly Glu Gln Arg Trp Glu Gln Ala Trp Ile Ala Ile Lys
 1250 1255 1260

Lys Val Trp Gly Ser Lys Trp Asn Glu Arg Ala Tyr Phe Ser Thr
 1265 1270 1275

Arg Lys Val Lys Leu Asp His Glu Tyr Leu Ser Met Ala Val Leu
 1280 1285 1290

Val Gln Glu Val Ile Asn Ala Asp Tyr Ala Phe Val Ile His Thr
 1295 1300 1305

Thr Asn Pro Ala Ser Gly Asp Ser Ser Gly Ile Tyr Ala Glu Val
 1310 1315 1320

Val Lys Gly Leu Gly Glu Thr Leu Val Gly Ala Tyr Pro Gly Arg
 1325 1330 1335

Ala Leu Ser Phe Ile Cys Lys Lys Arg Asp Leu Asn Ser Pro Gln
 1340 1345 1350

Val Leu Gly Tyr Pro Ser Lys Pro Val Gly Leu Phe Ile Arg Gln
 1355 1360 1365

BCS 04-5003_Erhöhte Akt. OK1 & R1_SEQUENZPROTOKOLL_ST25

Ser Ile Ile Phe Arg Ser Asp Ser Asn Gly Glu Asp Leu Glu Gly
 1370 1375 1380 1385 1390 1395 1400 1405 1410 1415 1420 1425 1430 1435 1440 1445 1450 1455
 Tyr Ala Gly Ala Gly Leu Tyr Asp Ser Val Pro Met Asp Glu Ala
 Glu Lys Val Val Leu Asp Tyr Ser Ser Asp Lys Leu Ile Leu Asp
 Gly Ser Phe Arg Gln Ser Ile Leu Ser Ser Ile Ala Arg Ala Gly
 Asn Glu Ile Glu Glu Leu Tyr Gly Thr Pro Gln Asp Ile Glu Gly
 Val Ile Lys Asp Gly Lys Val Tyr Val Val Gln Thr Arg Pro Gln

Met

<210> 16
 <211> 4846
 <212> DNA
 <213> Zea mays

<220>
 <221> CDS
 <222> (158)..(4567)
 <223>

<300>
 <308> NCBI / AR400813
 <309> 2003-12-18

<400> 16	60
ccacgcgtcc ggcttcatct tgctgatcg gtccgtggct tcttgatact ccgtgactgt	120
ctccgtccga agcgagtgag caagccgacc aacagcggct gagattcgct gcaacgtcgg	175
tatcaaaagg tgtccgagcg gttgagattc gcgtgcc atg tcc gga ttc agt gcc	
Met Ser Gly Phe Ser Ala	
1 5	
gag gct tcc gca gtc gca	223
Ala Ala Asn Ala Ala Ala Ala Glu Arg Cys Ala Leu Ala Phe Arg Ala	
10 15 20	

BCS 04-5003_Erhöhte Akt. OK1 & R1_SEQUENZPROTOKOLL_ST25

cgg ccc gcg gcc tcc tcg cca gcg aag cgg cag cag cag ccc cag cca	271
Arg Pro Ala Ala Ser Ser Pro Ala Lys Arg Gln Gln Pro Gln Pro	
25 30 35	
gct tcc ctc cga cgc agc ggg ggc cag cgc cgc ccc acg acg ctc tcc	319
Ala Ser Leu Arg Arg Ser Gly Gly Gln Arg Arg Pro Thr Thr Leu Ser	
40 45 50	
gcc tct agc cgc ggc ccc gtc gtg cgc cgc gcc gtc gcc acg tcc gcg	367
Ala Ser Ser Arg Gly Pro Val Val Pro Arg Ala Val Ala Thr Ser Ala	
55 60 65 70	
gac cgc gcg tcc ccc gac ctt atc gga aag ttc acg ctg gat tcc aac	415
Asp Arg Ala Ser Pro Asp Leu Ile Gly Lys Phe Thr Leu Asp Ser Asn	
75 80 85	
tcc gag ctc cag gtc gca gtg aac cca gcg ccc cag ggt ttg gtg tca	463
Ser Glu Leu Gln Val Ala Val Asn Pro Ala Pro Gln Gly Leu Val Ser	
90 95 100	
gag att agc ctg gag gtg acc aac aca agc ggt tcc ctg att ttg cat	511
Glu Ile Ser Leu Glu Val Thr Asn Thr Ser Gly Ser Leu Ile Leu His	
105 110 115	
tgg gga gcc ctt cgc ccg gac aag aga gat tgg atc ctc ccg tcc aga	559
Trp Gly Ala Leu Arg Pro Asp Lys Arg Asp Trp Ile Leu Pro Ser Arg	
120 125 130	
aaa cct gat gga acg aca gtg tac aag aac agg gct ctc agg aca cct	607
Lys Pro Asp Gly Thr Thr Val Tyr Lys Asn Arg Ala Leu Arg Thr Pro	
135 140 145 150	
ttt gta aag tca ggt gat aac tcc act cta agg att gag ata gat gat	655
Phe Val Lys Ser Gly Asp Asn Ser Thr Leu Arg Ile Glu Ile Asp Asp	
155 160 165	
cct ggg gtg cac gcc att gag ttc ctc atc ttt gac gag aca cag aac	703
Pro Gly Val His Ala Ile Glu Phe Leu Ile Phe Asp Glu Thr Gln Asn	
170 175 180	
aaa tgg ttt aaa aac aat ggc cag aat ttt cag gtt cag ttc cag tcg	751
Lys Trp Phe Lys Asn Asn Gly Gln Asn Phe Gln Val Gln Phe Gln Ser	
185 190 195	
agc cgc cat cag ggt act ggt gca tct ggt gcc tcc tct tct gct act	799
Ser Arg His Gln Gly Thr Gly Ala Ser Gly Ala Ser Ser Ser Ala Thr	
200 205 210	
tct acc ttg gtg cca gag gat ctt gtg cag atc caa gct tac ctt cgg	847
Ser Thr Leu Val Pro Glu Asp Leu Val Gln Ile Gln Ala Tyr Leu Arg	
215 220 225 230	
tgg gaa aga agg gga aag cag tca tac aca cca gag caa gaa aag gag	895
Trp Glu Arg Arg Gly Lys Gln Ser Tyr Thr Pro Glu Gln Glu Lys Glu	
235 240 245	
gag tat gaa gct gca cga gct gag tta ata gag gaa gta aac aga ggt	943
Glu Tyr Glu Ala Ala Arg Ala Glu Leu Ile Glu Glu Val Asn Arg Gly	
250 255 260	
gtt tct tta gag aag ctt cga gct aaa ttg aca aaa gca cct gaa gca	991
Val Ser Leu Glu Lys Leu Arg Ala Lys Leu Thr Lys Ala Pro Glu Ala	
265 270 275	
cct gag tcg gat gaa agt aaa tct tct gca tct cga atg ccc atc ggt	1039
Pro Glu Ser Asp Glu Ser Lys Ser Ser Ala Ser Arg Met Pro Ile Gly	
280 285 290	

BCS 04-5003_Erhöhte Akt. OK1 & R1_SEQUENZPROTOKOLL, ST25

aaa ctt cca gag gat ctt gta cag gtg cag gct tat ata agg tgg gag	1087
Lys Leu Pro Glu Asp Leu Val Gln Val Gln Ala Tyr Ile Arg Trp Glu	
295 300 305 310	
caa gcg ggc aag cca aac tat cct cct gag aag caa ctg gta gaa ttt	1135
Gln Ala Gly Lys Pro Asn Tyr Pro Pro Glu Lys Gln Leu Val Glu Phe	
315 320 325	
gag gaa gca agg aag gaa ctg cag gct gag gtg gac aag gga atc tct	1183
Glu Glu Ala Arg Lys Glu Leu Gln Ala Glu Val Asp Lys Gly Ile Ser	
330 335 340	
att gat cag ttg agg cag aaa att ttg aaa gga aac att gag agt aaa	1231
Ile Asp Gln Leu Arg Gln Lys Ile Leu Lys Gly Asn Ile Glu Ser Lys	
345 350 355	
gtt tcc aag cag ctg aag aac aag aag tac ttc tct gta gaa agg att	1279
Val Ser Lys Gln Leu Lys Asn Lys Lys Tyr Phe Ser Val Glu Arg Ile	
360 365 370	
cag cgc aaa aag aga gat atc aca caa ctt ctc agt aaa cat aag cat	1327
Gln Arg Lys Lys Arg Asp Ile Thr Gln Leu Leu Ser Lys His Lys His	
375 380 385 390	
aca ctt gtg gaa gat aaa gta gag gtt gta cca aaa caa cca act gtt	1375
Thr Leu Val Glu Asp Lys Val Glu Val Val Pro Lys Gln Pro Thr Val	
395 400 405	
ctt gat ctc ttc acc aag tct tta cat gag aag gat ggc tgc gaa gtt	1423
Leu Asp Leu Phe Thr Lys Ser Leu His Glu Lys Asp Gly Cys Glu Val	
410 415 420	
cta agc aga aag ctc ttc aag ttc ggc gat aaa gag ata ctg gca att	1471
Leu Ser Arg Lys Leu Phe Lys Phe Gly Asp Lys Glu Ile Leu Ala Ile	
425 430 435	
tct acc aag gtt caa aat aaa aca gaa gtt cac ttg gca aca aac cat	1519
Ser Thr Lys Val Gln Asn Lys Thr Glu Val His Leu Ala Thr Asn His	
440 445 450	
acc gac cca ctt att ctt cac tgg tct ttg gca aaa aat gct gga gaa	1567
Thr Asp Pro Leu Ile Leu His Trp Ser Leu Ala Lys Asn Ala Gly Glu	
455 460 465 470	
tgg aag gca cct tct cca aat ata ttg cca tct ggt tcc aca ttg ctg	1615
Trp Lys Ala Pro Ser Pro Asn Ile Leu Pro Ser Gly Ser Thr Leu Leu	
475 480 485	
gac aag gcg tgt gaa act gaa ttt act aaa tct gaa ttg gat ggt ttg	1663
Asp Lys Ala Cys Glu Thr Glu Phe Thr Lys Ser Glu Leu Asp Gly Leu	
490 495 500	
cat tac cag gtt gtt gag ata gag ctt gat gat gga gga tac aaa gga	1711
His Tyr Gln Val Val Glu Ile Glu Leu Asp Asp Gly Gly Tyr Lys Gly	
505 510 515	
atg cca ttt gtt ctt cgg tct ggt gaa aca tgg aaa aaa aat aat ggt	1759
Met Pro Phe Val Leu Arg Ser Gly Glu Thr Trp Lys Lys Asn Asn Gly	
520 525 530	
tct gat ttt ttc cta gat ttc agc acc cat gat gtc aga aat att aag	1807
Ser Asp Phe Phe Leu Asp Phe Ser Thr His Asp Val Arg Asn Ile Lys	
535 540 545 550	
tta aag ggc aat ggt gat gct ggt aaa ggt act gct aag gca ttg ctg	1855
Leu Lys Gly Asn Gly Asp Ala Gly Lys Gly Thr Ala Lys Ala Leu Leu	
555 560 565	

BCS 04-5003_Erhöhte Akt. OK1 & R1_SEQUENZPROTOKOLL, ST25

gag	aga	ata	gca	gat	ctg	gag	gaa	gat	gcc	cag	cga	tct	ctt	atg	cac	1903
Glu	Arg	Ile	Ala	Asp	Leu	Glu	Glu	Asp	Ala	Gln	Arg	Ser	Leu	Met	His	
570						575							580			
aga	ttc	aat	att	gca	gca	gat	cta	gct	gac	caa	gcc	aga	gat	gct	gga	1951
Arg	Phe	Asn	Ile	Ala	Ala	Asp	Leu	Ala	Asp	Gln	Ala	Arg	Asp	Ala	Gly	
585						590						595				
ctt	ttg	ggt	att	gtt	ggg	ctt	ttt	gtt	tgg	att	aga	ttc	atg	gct	acc	1999
Leu	Leu	Gly	Ile	Val	Gly	Leu	Phe	Val	Trp	Ile	Arg	Phe	Met	Ala	Thr	
600						605				610						
agg	caa	cta	aca	tgg	aat	aag	aac	tat	aat	gtg	aag	cca	cgt	gag	ata	2047
Arg	Gln	Leu	Thr	Trp	Asn	Lys	Asn	Tyr	Asn	Val	Lys	Pro	Arg	Glu	Ile	
615					620				625					630		
agc	aaa	gca	cag	gat	agg	ttt	aca	gat	gat	ctt	gag	aat	atg	tac	aaa	2095
Ser	Lys	Ala	Gln	Asp	Arg	Phe	Thr	Asp	Asp	Leu	Glu	Asn	Met	Tyr	Lys	
635					640					645						
gct	tat	cca	cag	tac	aga	gag	ata	tta	aga	atg	ata	atg	gct	gct	gtt	2143
Ala	Tyr	Pro	Gln	Tyr	Arg	Glu	Ile	Leu	Arg	Met	Ile	Met	Ala	Ala	Val	
650					655				660							
ggt	cgc	gga	ggt	gaa	ggt	gat	gtt	ggt	caa	cgc	att	cgt	gat	gag	ata	2191
Gly	Arg	Gly	Gly	Glu	Gly	Asp	Val	Gly	Gln	Arg	Ile	Arg	Asp	Glu	Ile	
665					670				675							
tta	gta	ata	cag	aga	aat	aat	gac	tgc	aaa	ggt	gga	atg	atg	gaa	gaa	2239
Leu	Val	Ile	Gln	Arg	Asn	Asn	Asp	Cys	Lys	Gly	Gly	Met	Met	Glu	Glu	
680					685				690							
tgg	cac	cag	aaa	ttg	cac	aac	aat	aca	agc	cca	gat	gat	gta	gtg	ata	2287
Trp	His	Gln	Lys	Leu	His	Asn	Asn	Thr	Ser	Pro	Asp	Asp	Val	Val	Ile	
695					700				705					710		
tgc	cag	gcc	tta	att	gat	tat	atc	aag	agt	gac	ttt	gat	ata	agc	gtt	2335
Cys	Gln	Ala	Leu	Ile	Asp	Tyr	Ile	Lys	Ser	Asp	Phe	Asp	Ile	Ser	Val	
					715				720					725		
tac	tgg	gac	acc	ttg	aac	aaa	aat	ggc	ata	acc	aaa	gag	cgt	ctc	ttg	2383
Tyr	Trp	Asp	Thr	Leu	Asn	Lys	Asn	Gly	Ile	Thr	Lys	Glu	Arg	Leu	Leu	
					730				735			740				
agc	tat	gat	cgt	gct	att	cat	tca	gaa	cca	aat	ttc	aga	agt	gaa	cag	2431
Ser	Tyr	Asp	Arg	Ala	Ile	His	Ser	Glu	Pro	Asn	Phe	Arg	Ser	Glu	Gln	
745					750				755							
aag	gcg	ggt	tta	ctc	cgt	gac	ctg	gga	aat	tac	atg	aga	agc	cta	aag	2479
Lys	Ala	Gly	Leu	Leu	Arg	Asp	Leu	Gly	Asn	Tyr	Met	Arg	Ser	Leu	Lys	
760					765				770							
gct	gtg	cat	tct	ggt	gct	gat	ctt	gaa	tct	gct	ata	gca	agt	tgt	atg	2527
Ala	Val	His	Ser	Gly	Ala	Asp	Leu	Glu	Ser	Ala	Ile	Ala	Ser	Cys	Met	
775					780				785					790		
gga	tac	aaa	tca	gag	ggt	gaa	ggt	ttc	atg	gtt	ggt	gtt	cag	atc	aat	2575
Gly	Tyr	Lys	Ser	Glu	Gly	Glu	Gly	Phe	Met	Val	Gly	Val	Gln	Ile	Asn	
					795				800				805			
cca	gtg	aag	ggt	tta	cca	tct	gga	ttt	ccg	gag	ttg	ctt	gaa	ttt	gtg	2623
Pro	Val	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Gly	Phe	Pro	Glu	Leu	Leu	Glu	Phe	Val	
					810				815			820				
ctt	gaa	cat	gtt	gag	gat	aaa	tca	gcg	gaa	cca	ctt	ctt	gag	ggg	cta	2671
Leu	Glu	His	Val	Glu	Asp	Lys	Ser	Ala	Glu	Pro	Leu	Leu	Glu	Gly	Leu	
					825				830			835				

BCS 04-5003_Erhöhte Akt. OK1 & R1_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

ttg	gaa	gct	cga	gtt	gaa	ctg	cgc	cct	ttg	ctt	ctt	gat	tcg	cgt	gaa	2719
Leu	Glu	Ala	Arg	Val	Glu	Leu	Arg	Pro	Leu	Leu	Leu	Asp	Ser	Arg	Glu	
840	845									850						
cgc	atg	aaa	gat	ctt	ata	ttt	ttg	gac	att	gct	ctt	gat	tct	acc	ttc	2767
Arg	Met	Lys	Asp	Leu	Ile	Phe	Leu	Asp	Ile	Ala	Leu	Asp	Ser	Thr	Phe	
855										865					870	
agg	aca	gca	att	gaa	agg	tca	tat	gag	gag	ctg	aat	gat	gca	gcc	cca	2815
Arg	Thr	Ala	Ile	Glu	Arg	Ser	Tyr	Glu	Glu	Leu	Asn	Asp	Ala	Ala	Pro	
									880					885		
gag	aaa	ata	atg	tac	ttc	atc	agt	ctt	gtc	ctt	gaa	aat	ctt	gcg	ctt	2863
Glu	Lys	Ile	Met	Tyr	Phe	Ile	Ser	Leu	Val	Leu	Glu	Asn	Leu	Ala	Leu	
									895					900		
tca	att	gac	gac	aat	gaa	gac	atc	ctg	tat	tgt	tta	aag	gga	tgg	aac	2911
Ser	Ile	Asp	Asp	Asn	Glu	Asp	Ile	Leu	Tyr	Cys	Leu	Lys	Gly	Trp	Asn	
									910					915		
caa	gcc	ttg	gaa	atg	gct	aag	caa	aaa	gac	gac	caa	tgg	gcg	ctc	tat	2959
Gln	Ala	Leu	Glu	Met	Ala	Lys	Gln	Lys	Asp	Asp	Gln	Trp	Ala	Leu	Tyr	
									925					930		
gct	aaa	gca	ttt	ctt	gac	aga	aac	aga	ctt	gcc	ctt	gcg	agc	aag	gga	3007
Ala	Lys	Ala	Phe	Leu	Asp	Arg	Asn	Arg	Leu	Ala	Leu	Ala	Ser	Lys	Gly	
									940					945		
935															950	
gaa	caa	tac	cat	aat	atg	atg	cag	ccc	tct	gct	gag	tat	ctt	ggc	tcg	3055
Glu	Gln	Tyr	His	Asn	Met	Met	Gln	Pro	Ser	Ala	Glu	Tyr	Leu	Gly	Ser	
									955					960		
														965		
tta	ctc	agc	ata	gac	caa	tgg	gca	gtc	aat	atc	ttc	aca	gaa	gaa	att	3103
Leu	Leu	Ser	Ile	Asp	Gln	Trp	Ala	Val	Asn	Ile	Phe	Thr	Glu	Glu	Ile	
									970					975		
														980		
ata	cgc	ggg	gga	tca	gct	gct	act	cgt	tct	gct	ctt	ctg	aac	cga	ttt	3151
Ile	Arg	Gly	Gly	Ser	Ala	Ala	Thr	Leu	Ser	Ala	Leu	Leu	Asn	Arg	Phe	
									985					990		
														995		
gat	cct	gtt	tta	agg	aat	gtt	gct	cac	ctc	gga	agt	tgg	cag	gtt	3196	
Asp	Pro	Val	Leu	Arg	Asn	Val	Ala	His	Leu	Gly	Ser	Trp	Gln	Val		
									1000					1005		
														1010		
ata	agc	ccg	gtt	gaa	gtt	tca	ggt	tat	gtg	gtt	gtg	gtt	gat	gag	3241	
Ile	Ser	Pro	Val	Glu	Val	Ser	Gly	Tyr	Val	Val	Val	Val	Asp	Glu		
									1015					1020		
														1025		
tta	ctt	gct	gtc	cag	aaa	tct	tat	gat	aaa	cca	acc	atc	ctt		3286	
Leu	Leu	Ala	Val	Gln	Asn	Ser	Ser	Tyr	Asp	Lys	Pro	Thr	Ile	Leu		
									1030					1035		
														1040		
gtg	gca	aag	agt	gtc	aag	gga	gag	gaa	gaa	ata	cca	gat	gga	gta	3331	
Val	Ala	Lys	Ser	Val	Lys	Gly	Glü	Glü	Glü	Ile	Pro	Asp	Gly	Val		
									1045					1050		
														1055		
gtt	ggt	gta	att	aca	cct	gat	atg	cca	gat	gtt	ctg	tct	cat	gtg	3376	
Val	Gly	Val	Ile	Thr	Pro	Asp	Met	Pro	Asp	Val	Leu	Ser	His	Val		
									1060					1065		
														1070		
tca	gtc	cga	gca	agg	aat	agc	aag	gta	ctg	ttt	gct	acc	tgt	ttt	3421	
Ser	Val	Arg	Ala	Arg	Asn	Ser	Lys	Val	Leu	Phe	Ala	Thr	Cys	Phe		
									1075					1080		
														1085		
gac	cac	acc	act	cta	tct	gaa	ctt	gaa	gga	tat	gat	cag	aaa	ctg	3466	
Asp	His	Thr	Thr	Leu	Ser	Glu	Leu	Glu	Gly	Tyr	Asp	Gln	Lys	Leu		
									1090					1095		
														1100		

BCS 04-5003_Erhöhte Akt. OK1 & R1_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

ttt	tcc	ttc	aag	cct	act	tct	gca	gat	ata	acc	tat	agg	gag	atc	3511
Phe	Ser	Phe	Lys	Pro	Thr	Ser	Ala	Asp	Ile	Thr	Tyr	Arg	Glu	Ile	
1105						1110					1115				
aca	gag	agt	gaa	ctt	cag	caa	tca	agt	tct	cca	aat	gca	gaa	gtt	3556
Thr	Glu	Ser	Glu	Leu	Gln	Gln	Ser	Ser	Ser	Pro	Asn	Ala	Glu	Val	
1120						1125					1130				
ggc	cat	gca	gta	cca	tct	att	tca	ttg	gcc	aag	aag	aaa	ttt	ctt	3601
Gly	His	Ala	Val	Pro	Ser	Ile	Ser	Leu	Ala	Lys	Lys	Lys	Phe	Leu	
1135						1140					1145				
gga	aaa	tat	gca	ata	tca	gcc	gaa	gaa	tcc	tct	gag	gaa	atg	gtt	3646
Gly	Lys	Tyr	Ala	Ile	Ser	Ala	Glü	Glü	Phe	Ser	Glü	Glü	Met	Val	
1150						1155					1160				
ggg	gcc	aag	tct	cg	aat	ata	gca	tac	ctc	aaa	gga	aaa	gta	cct	3691
Gly	Ala	Lys	Ser	Arg	Asn	Ile	Ala	Tyr	Leu	Lys	Gly	Lys	Val	Pro	
1165						1170					1175				
tca	tgg	gtc	gg	gtc	cca	ac	tca	gtt	gc	ata	cca	ttt	ggc	act	3736
Ser	Trp	Val	Gly	Val	Pro	Thr	Ser	Val	Ala	Ile	Pro	Phe	Gly	Thr	
1180						1185					1190				
ttt	gag	aag	gtt	ttg	tca	gat	ggg	ctt	aat	aag	gaa	gta	gca	cag	3781
Phe	Glu	Lys	Val	Leu	Ser	Asp	Gly	Leu	Asn	Lys	Glü	Val	Ala	Gln	
1195						1200					1205				
agc	ata	gag	aag	ctt	aag	atc	aga	ctt	gcc	caa	gaa	gat	ttt	agt	3826
Ser	Ile	Glü	Lys	Leu	Lys	Ile	Arg	Leu	Ala	Gln	Glü	Asp	Phe	Ser	
1210						1215					1220				
gct	cta	ggt	gaa	ata	aga	aaa	gtc	gtc	ctt	aat	ctt	act	gct	cct	3871
Ala	Leu	Gly	Glü	Ile	Arg	Lys	Val	Val	Leu	Asn	Leu	Thr	Ala	Pro	
1225						1230					1235				
atg	caa	ttg	gtt	aat	gag	ctg	aag	gag	agg	atg	ctt	gyc	tct	gga	3916
Met	Gln	Leu	Val	Asn	Glu	Leu	Lys	Glu	Arg	Met	Leu	Gly	Ser	Gly	
1240						1245					1250				
atg	ccc	tgg	cct	gg	gt	gat	gaa	gac	aag	cgt	tgg	gag	caa	gca	3961
Met	Pro	Trp	Pro	Gly	Asp	Glu	Gly	Asp	Lys	Arg	Trp	Glü	Gln	Ala	
1255						1260					1265				
tgg	atg	gct	att	aaa	aag	gtt	tgg	gca	tca	aaa	tgg	aac	gaa	aga	4006
Trp	Met	Ala	Ile	Lys	Lys	Val	Trp	Ala	Ser	Lys	Trp	Asn	Glu	Arg	
1270						1275					1280				
gca	tat	ttt	agc	aca	cgc	aag	gtg	aaa	ctt	gat	cat	gag	tac	ctt	4051
Ala	Tyr	Phe	Ser	Thr	Arg	Lys	Val	Lys	Leu	Asp	His	Glü	Tyr	Leu	
1285						1290					1295				
tcg	atg	gct	gtt	ctc	gt	caa	gaa	gtt	gt	aat	gca	gat	tat	gct	4096
Ser	Met	Ala	Val	Leu	Val	Gln	Glu	Val	Val	Asn	Ala	Asp	Tyr	Ala	
1300						1305					1310				
ttt	gtc	att	cat	acc	aca	aac	cca	tcg	tct	gga	gat	tct	tct	gag	4141
Phe	Val	Ile	His	Thr	Thr	Asn	Pro	Ser	Ser	Gly	Asp	Ser	Ser	Glu	
1315						1320					1325				
ata	tat	gct	gaa	gt	gt	aaa	ggg	ctt	ggc	gag	acc	ctc	gt	gga	4186
Ile	Tyr	Ala	Glu	Val	Val	Lys	Gly	Leu	Gly	Glü	Thr	Leu	Val	Gly	
1330						1335					1340				
gcc	tat	cct	gg	cgt	gct	atg	agc	ttt	gt	tgc	aaa	aaa	gat	gac	4231
Ala	Tyr	Pro	Gly	Arg	Ala	Met	Ser	Phe	Val	Cys	Lys	Lys	Asp	Asp	
1345						1350					1355				

BCS 04-5003_Erhöhte Akt. OK1 & R1_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

ctt	gac	tct	ccc	aag	tta	ctt	ggt	tac	cca	agc	aag	cca	att	ggt	4276
Leu	Asp	Ser	Pro	Lys	Leu	Leu	Gly	Tyr	Pro	Ser	Lys	Pro	Ile	Gly	
1360					1365						1370				
ctc	ttc	ata	agg	caa	tca	atc	atc	ttc	cgt	tcc	gac	tcc	aac	ggt	4321
Leu	Phe	Ile	Arg	Gln	Ser	Ile	Ile	Phe	Arg	Ser	Asp	Ser	Asn	Gly	
1375						1380					1385				
gag	gac	ctg	gaa	ggt	tat	gct	gga	gca	gga	tta	tat	gat	agt	gta	4366
Glu	Asp	Leu	Glu	Gly	Tyr	Ala	Gly	Ala	Gly	Leu	Tyr	Asp	Ser	Val	
1390						1395					1400				
ccg	atg	gat	gag	gag	gat	gag	gtt	gta	ctt	gat	tat	aca	act	gac	4411
Pro	Met	Asp	Glu	Glu	Asp	Glu	Val	Val	Leu	Asp	Tyr	Thr	Thr	Asp	
1405						1410					1415				
cct	ctt	ata	gta	gac	cgt	gga	ttc	cga	agc	tca	atc	ctc	tca	agc	4456
Pro	Leu	Ile	Val	Asp	Arg	Gly	Phe	Arg	Ser	Ser	Ile	Leu	Ser	Ser	
1420						1425					1430				
ata	gca	cg	gct	ggc	cat	gcc	atc	gag	gag	cta	tat	ggt	tct	cct	4501
Ile	Ala	Arg	Ala	Gly	His	Ala	Ile	Glu	Glu	Leu	Tyr	Gly	Ser	Pro	
1435						1440					1445				
cag	gac	gtc	gag	gga	gta	gtg	aag	gat	gga	aaa	atc	tat	gta	gtc	4546
Gln	Asp	Val	Glu	Gly	Val	Val	Lys	Asp	Gly	Lys	Ile	Tyr	Val	Val	
1450						1455					1460				
cag	aca	aga	cca	cag	atg	tag	tatgtatgca	tctattagac	agctcaataa						4597
Gln	Thr	Arg	Pro	Gln	Met										
1465															
gcactgtgt acgcttgtat ggtggaca tatggcgtt atggcatgta tagttgtatg															4657
cctagatgta caacacgtgt actcgatata atatatataa atgctgaaac aagcattgg															4717
cctgtactgt agtttctaca tttcattgtc accaataatt aagtgtactc ctatggctgg															4777
gagtctatga aaatggacgt gttgacttat tgggtataata ataatttata taaaaaaaaa															4837
aaaaaaaaag															4846

<210> 17

<211> 1469

<212> PRT

<213> Zea mays

<400> 17

Met	Ser	Gly	Phe	Ser	Ala	Ala	Ala	Asn	Ala	Ala	Ala	Ala	Glu	Arg	Cys
1				5					10				15		

Ala	Leu	Ala	Phe	Arg	Ala	Arg	Pro	Ala	Ala	Ser	Ser	Pro	Ala	Lys	Arg
			20									30			

Gln	Gln	Gln	Pro	Gln	Pro	Ala	Ser	Leu	Arg	Arg	Ser	Gly	Gly	Gln	Arg
35						40					45				

BCS 04-5003_Erhöhte Akt. OK1 & R1_SEQUENZPROTOKOLL.ST25
Arg Pro Thr Thr Leu Ser Ala Ser Ser Arg Gly Pro Val Val Pro Arg
50 55 60

Ala Val Ala Thr Ser Ala Asp Arg Ala Ser Pro Asp Leu Ile Gly Lys
65 70 75 80

Phe Thr Leu Asp Ser Asn Ser Glu Leu Gln Val Ala Val Asn Pro Ala
85 90 95

Pro Gln Gly Leu Val Ser Glu Ile Ser Leu Glu Val Thr Asn Thr Ser
100 105 110

Gly Ser Leu Ile Leu His Trp Gly Ala Leu Arg Pro Asp Lys Arg Asp
115 120 125

Trp Ile Leu Pro Ser Arg Lys Pro Asp Gly Thr Thr Val Tyr Lys Asn
130 135 140

Arg Ala Leu Arg Thr Pro Phe Val Lys Ser Gly Asp Asn Ser Thr Leu
145 150 155 160

Arg Ile Glu Ile Asp Asp Pro Gly Val His Ala Ile Glu Phe Leu Ile
165 170 175

Phe Asp Glu Thr Gln Asn Lys Trp Phe Lys Asn Asn Gly Gln Asn Phe
180 185 190

Gln Val Gln Phe Gln Ser Ser Arg His Gln Gly Thr Gly Ala Ser Gly
195 200 205

Ala Ser Ser Ser Ala Thr Ser Thr Leu Val Pro Glu Asp Leu Val Gln
210 215 220

Ile Gln Ala Tyr Leu Arg Trp Glu Arg Arg Gly Lys Gln Ser Tyr Thr
225 230 235 240

Pro Glu Gln Glu Lys Glu Glu Tyr Glu Ala Ala Arg Ala Glu Leu Ile
245 250 255

Glu Glu Val Asn Arg Gly Val Ser Leu Glu Lys Leu Arg Ala Lys Leu
260 265 270

Thr Lys Ala Pro Glu Ala Pro Glu Ser Asp Glu Ser Lys Ser Ser Ala
275 280 285

Ser Arg Met Pro Ile Gly Lys Leu Pro Glu Asp Leu Val Gln Val Gln
290 295 300

Ala Tyr Ile Arg Trp Glu Gln Ala Gly Lys Pro Asn Tyr Pro Pro Glu
305 310 315 320

BCS 04-5003_Erhöhte Akt. OK1 & R1_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

Lys Gln Leu Val Glu Phe Glu Glu Ala Arg Lys Glu Leu Gln Ala Glu
325 330 335

Val Asp Lys Gly Ile Ser Ile Asp Gln Leu Arg Gln Lys Ile Leu Lys
340 345 350

Gly Asn Ile Glu Ser Lys Val Ser Lys Gln Leu Lys Asn Lys Lys Tyr
355 360 365

Phe Ser Val Glu Arg Ile Gln Arg Lys Lys Arg Asp Ile Thr Gln Leu
370 375 380

Leu Ser Lys His Lys His Thr Leu Val Glu Asp Lys Val Glu Val Val
385 390 395 400

Pro Lys Gln Pro Thr Val Leu Asp Leu Phe Thr Lys Ser Leu His Glu
405 410 415

Lys Asp Gly Cys Glu Val Leu Ser Arg Lys Leu Phe Lys Phe Gly Asp
420 425 430

Lys Glu Ile Leu Ala Ile Ser Thr Lys Val Gln Asn Lys Thr Glu Val
435 440 445

His Leu Ala Thr Asn His Thr Asp Pro Leu Ile Leu His Trp Ser Leu
450 455 460

Ala Lys Asn Ala Gly Glu Trp Lys Ala Pro Ser Pro Asn Ile Leu Pro
465 470 475 480

Ser Gly Ser Thr Leu Leu Asp Lys Ala Cys Glu Thr Glu Phe Thr Lys
485 490 495

Ser Glu Leu Asp Gly Leu His Tyr Gln Val Val Glu Ile Glu Leu Asp
500 505 510

Asp Gly Gly Tyr Lys Gly Met Pro Phe Val Leu Arg Ser Gly Glu Thr
515 520 525

Trp Lys Lys Asn Asn Gly Ser Asp Phe Phe Leu Asp Phe Ser Thr His
530 535 540

Asp Val Arg Asn Ile Lys Leu Lys Gly Asn Gly Asp Ala Gly Lys Gly
545 550 555 560

Thr Ala Lys Ala Leu Leu Glu Arg Ile Ala Asp Leu Glu Glu Asp Ala
565 570 575

Gln Arg Ser Leu Met His Arg Phe Asn Ile Ala Ala Asp Leu Ala Asp
580 585 590

BCS 04-5003_Erhöhte Akt. OK1 & R1_SEQUENZPROTOKOLL.ST25
Gln Ala Arg Asp Ala Gly Leu Leu Gly Ile Val Gly Leu Phe Val Trp
595 600 605

Ile Arg Phe Met Ala Thr Arg Gln Leu Thr Trp Asn Lys Asn Tyr Asn
610 615 620

Val Lys Pro Arg Glu Ile Ser Lys Ala Gln Asp Arg Phe Thr Asp Asp
625 630 635 640

Leu Glu Asn Met Tyr Lys Ala Tyr Pro Gln Tyr Arg Glu Ile Leu Arg
645 650 655

Met Ile Met Ala Ala Val Gly Arg Gly Glu Gly Asp Val Gly Gln
660 665 670

Arg Ile Arg Asp Glu Ile Leu Val Ile Gln Arg Asn Asn Asp Cys Lys
675 680 685

Gly Gly Met Met Glu Glu Trp His Gln Lys Leu His Asn Asn Thr Ser
690 695 700

Pro Asp Asp Val Val Ile Cys Gln Ala Leu Ile Asp Tyr Ile Lys Ser
705 710 720

Asp Phe Asp Ile Ser Val Tyr Trp Asp Thr Leu Asn Lys Asn Gly Ile
725 730 735

Thr Lys Glu Arg Leu Leu Ser Tyr Asp Arg Ala Ile His Ser Glu Pro
740 745 750

Asn Phe Arg Ser Glu Gln Lys Ala Gly Leu Leu Arg Asp Leu Gly Asn
755 760 765

Tyr Met Arg Ser Leu Lys Ala Val His Ser Gly Ala Asp Leu Glu Ser
770 775 780

Ala Ile Ala Ser Cys Met Gly Tyr Lys Ser Glu Gly Glu Gly Phe Met
785 790 795 800

Val Gly Val Gln Ile Asn Pro Val Lys Gly Leu Pro Ser Gly Phe Pro
805 810 815

Glu Leu Leu Glu Phe Val Leu Glu His Val Glu Asp Lys Ser Ala Glu
820 825 830

Pro Leu Leu Glu Gly Leu Leu Glu Ala Arg Val Glu Leu Arg Pro Leu
835 840 845

Leu Leu Asp Ser Arg Glu Arg Met Lys Asp Leu Ile Phe Leu Asp Ile
850 855 860

BCS 04-5003_Erhöhte Akt. OK1 & R1_SEQUENZPROTOKOLL, ST25

Ala Leu Asp Ser Thr Phe Arg Thr Ala Ile Glu Arg Ser Tyr Glu Glu
865 870 875 880

Leu Asn Asp Ala Ala Pro Glu Lys Ile Met Tyr Phe Ile Ser Leu Val
885 890 895

Leu Glu Asn Leu Ala Leu Ser Ile Asp Asp Asn Glu Asp Ile Leu Tyr
900 905 910

Cys Leu Lys Gly Trp Asn Gln Ala Leu Glu Met Ala Lys Gln Lys Asp
915 920 925

Asp Gln Trp Ala Leu Tyr Ala Lys Ala Phe Leu Asp Arg Asn Arg Leu
930 935 940

Ala Leu Ala Ser Lys Gly Glu Gln Tyr His Asn Met Met Gln Pro Ser
945 950 955 960

Ala Glu Tyr Leu Gly Ser Leu Leu Ser Ile Asp Gln Trp Ala Val Asn
965 970 975

Ile Phe Thr Glu Glu Ile Ile Arg Gly Gly Ser Ala Ala Thr Leu Ser
980 985 990

Ala Leu Leu Asn Arg Phe Asp Pro Val Leu Arg Asn Val Ala His Leu
995 1000 1005

Gly Ser Trp Gln Val Ile Ser Pro Val Glu Val Ser Gly Tyr Val
1010 1015 1020

Val Val Val Asp Glu Leu Leu Ala Val Gln Asn Lys Ser Tyr Asp
1025 1030 1035

Lys Pro Thr Ile Leu Val Ala Lys Ser Val Lys Gly Glu Glu Glu
1040 1045 1050

Ile Pro Asp Gly Val Val Gly Val Ile Thr Pro Asp Met Pro Asp
1055 1060 1065

Val Leu Ser His Val Ser Val Arg Ala Arg Asn Ser Lys Val Leu
1070 1075 1080

Phe Ala Thr Cys Phe Asp His Thr Thr Leu Ser Glu Leu Glu Gly
1085 1090 1095

Tyr Asp Gln Lys Leu Phe Ser Phe Lys Pro Thr Ser Ala Asp Ile
1100 1105 1110

Thr Tyr Arg Glu Ile Thr Glu Ser Glu Leu Gln Gln Ser Ser Ser
1115 1120 1125

BCS 04-5003_Erhöhte Akt. OK1 & R1_SEQUENZPROTOKOLL.ST25
Pro Asn Ala Glu Val Gly His Ala Val Pro Ser Ile Ser Leu Ala
1130 1135 1140

Lys Lys Lys Phe Leu Gly Lys Tyr Ala Ile Ser Ala Glu Glu Phe
1145 1150 1155

Ser Glu Glu Met Val Gly Ala Lys Ser Arg Asn Ile Ala Tyr Leu
1160 1165 1170

Lys Gly Lys Val Pro Ser Trp Val Gly Val Pro Thr Ser Val Ala
1175 1180 1185

Ile Pro Phe Gly Thr Phe Glu Lys Val Leu Ser Asp Gly Leu Asn
1190 1195 1200

Lys Glu Val Ala Gln Ser Ile Glu Lys Leu Lys Ile Arg Leu Ala
1205 1210 1215

Gln Glu Asp Phe Ser Ala Leu Gly Glu Ile Arg Lys Val Val Leu
1220 1225 1230

Asn Leu Thr Ala Pro Met Gln Leu Val Asn Glu Leu Lys Glu Arg
1235 1240 1245

Met Leu Gly Ser Gly Met Pro Trp Pro Gly Asp Glu Gly Asp Lys
1250 1255 1260

Arg Trp Glu Gln Ala Trp Met Ala Ile Lys Lys Val Trp Ala Ser
1265 1270 1275

Lys Trp Asn Glu Arg Ala Tyr Phe Ser Thr Arg Lys Val Lys Leu
1280 1285 1290

Asp His Glu Tyr Leu Ser Met Ala Val Leu Val Gln Glu Val Val
1295 1300 1305

Asn Ala Asp Tyr Ala Phe Val Ile His Thr Thr Asn Pro Ser Ser
1310 1315 1320

Gly Asp Ser Ser Glu Ile Tyr Ala Glu Val Val Lys Gly Leu Gly
1325 1330 1335

Glu Thr Leu Val Gly Ala Tyr Pro Gly Arg Ala Met Ser Phe Val
1340 1345 1350

Cys Lys Lys Asp Asp Leu Asp Ser Pro Lys Leu Leu Gly Tyr Pro
1355 1360 1365

Ser Lys Pro Ile Gly Leu Phe Ile Arg Gln Ser Ile Ile Phe Arg
1370 1375 1380

BCS 04-5003_Erhöhte Akt. OK1 & R1_SEQUENZPROTOKOLL.ST25
Ser Asp Ser Asn Gly Glu Asp Leu Glu Gly Tyr Ala Gly Ala Gly
1385 1390 1395

Leu Tyr Asp Ser Val Pro Met Asp Glu Glu Asp Glu Val Val Leu
1400 1405 1410

Asp Tyr Thr Thr Asp Pro Leu Ile Val Asp Arg Gly Phe Arg Ser
1415 1420 1425

Ser Ile Leu Ser Ser Ile Ala Arg Ala Gly His Ala Ile Glu Glu
1430 1435 1440

Leu Tyr Gly Ser Pro Gln Asp Val Glu Gly Val Val Lys Asp Gly
1445 1450 1455

Lys Ile Tyr Val Val Gln Thr Arg Pro Gln Met
1460 1465

